

Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitāte  
*Latvia University of Life Sciences and Technologies*

Veterinārmedicīnas fakultāte  
*Faculty of Veterinary Medicine*



Daiga Gāliņa 

## **REZISTENTĀ *ESCHERICHIA COLI* IZPLATĪBA CŪKĀM UN TĀ SAMAZINAŠANAS IESPĒJAS**

***PREVALENCE AND REDUCTION POSSIBILITIES OF  
RESISTANT *ESCHERICHIA COLI* IN PIGS***

Promocijas darba **KOPSAVILKUMS**

Zinātniskā doktora grāda (*Ph.D.*) iegūšanai  
Veterinārmedicīnas zinātnē

### **SUMMARY**

*of the Doctoral thesis for acquiring a Doctoral degree in  
Veterinary Medicine (Ph.D.)*

Jelgava  
2023

**Promocijas darbs izstrādāts** Latvijas Lauksaimniecības universitātes (LLU) Veterinārmedicīnas fakultātes Pārtikas un Vides higiēnas institūtā; LLU Biotehnoloģiju zinātniskās laboratorijas (BZL) Molekulārās bioloģijas un mikrobioloģijas nodaļā; LLU BZL Agronomisko analīžu nodaļā; LLU Veterinārmedicīnas fakultātes Prekliniskā institūta Salīdzinošās patoloģijas laboratorijā; LLU Veterinārās klinikas laboratorijā; Rīgas Austrumu Klīniskās Universitātes Slimnīcas Patoloģijas centrā; Latvijas Valsts Mežzinātnes institūta "Silava" Meža izejvielu pārstrādes laboratorijā; Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskā institūta "BIOR" Ķīmijas laboratorijā un Mikrobioloģijas un patoloģijas laboratorijā; Promocijas darba izstrādei paraugti iegūti septiņas cūku audzēšanas saimniecībās trīs Latvijas reģionos – Vidzemes, Pierīgas un Zemgales, bet sivēnu ēdināšanas pētījums veikts vienā cūku audzēšanas saimniecībā Pierīgas reģionā. Promocijas darbs izstrādāts laika periodā no 2014. līdz 2022. gadam.

**Promocijas darba zinātniskā vadītāja – Dr.med.vet. Anda Valdovska** – Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitātes (LBTU) Veterinārmedicīnas fakultātes profesore, Latvijas Zinātņu akadēmijas korespondētājocekle.

**Oficiālie recenzenti:**

**Dr.med. Juta Kroīča** – Rīgas Stradiņa Universitātes (RSU) Medicīnas fakultātes profesore, Bioloģijas un mikrobioloģijas katedras vadītāja;

**Dr.med.vet. Ilmārs Dūrītis** – Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitātes (LBTU) Veterinārmedicīnas fakultātes profesors;

**Dr.med.vet. Vita Antāne** – Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitātes (LBTU) Veterinārmedicīnas fakultātes profesore (*emeritus*).

**Promocijas darbs izstrādāts ar projekta VPP 2014/VPP2014-2017 AGROBIORES un projekta Nr. 8.2.2.0/20/I/001 finansiālu atbalstu.**

**Promocijas darba aizstāvēšana** notiks LBTU Veterinārmedicīnas zinātnes Promocijas padomes atklātā sēdē 2023. gada 24. februārī Veterinārmedicīnas fakultātē (Helmaņa iela 8, Jelgava) A100 auditorijā plkst. 13.00.

**Ar promocijas darbu var iepazīties** LBTU Fundamentālajā bibliotēkā, Lielā iela 2, Jelgavā un <http://llufb.llu.lv>

**Atsauksmes sūtīt** Promocijas padomes sekretārei vieslektorei **Mg.med.vet. Annai Krūklītei** – Helmaņa ielā 8, Jelgavā, LV-3004, e-pasts: anna.kruklite@lbtu.lv. Atsauksmes vēlams sūtīt ieskanētā veidā ar parakstu.

**The doctoral thesis has been carried out** at the Institute of Food and Environmental Hygiene of the Faculty of Veterinary Medicine the Latvia University of Life Sciences and Technologies (LLU); Division of Molecular Biology and Microbiology of the Research Laboratory of Biotechnology (RLB) the LLU; Division of Agronomic analysis the LLU RLB; Laboratory of Comparative Pathology of the Preclinical Institute the Faculty of Veterinary Medicine, the LLU; Laboratory of Forest Products Processing of the Latvian State Forest Research Institute “Silava”; Laboratory of Chemistry and Laboratory of Microbiology and Pathology of the Institute of Food Safety Animal health and Environmental “BIOR”; The samples for the development of the thesis were obtained from seven pig breeding farms in three regions of Latvia –Vidzeme, Pierīga and Zemgale, the piglet feeding experiment was carried out in one pig preeding farm in the Pierīgas region. The doctoral thesis was developed in the period from 2014 to 2022.

**Supervisor of the Doctoral thesis – Dr.med.vet. Anda Valdovska –** professor of the Faculty of Veterinary Medicine the Latvia University of Life Sciences and Technologies. Corresponding member of the Latvian Academy of Sciences.

**Official reviewers:**

**Dr. med. Juta Kroīča** – professor of the Faculty of Medicine the Rīga Stradiņš University (RSU). Head of the Department of Biology and Microbiology.

**Dr.med.vet. Ilmārs Dūrītis** – professor of the Faculty of Veterinary Medicine the Latvia University of Life Sciences and Technologies.

**Dr.med.vet. Vita Antāne** – professor (*emeritus*) of the Faculty of Veterinary Medicine the Latvia University of Life Sciences and Technologies.

**The doctoral thesis was developed with the financial support of** project VPP 2014/VPP2014-2017 AGROBIORES and project No 8.2.2.0/20/I/001.

**The defence of the doctoral thesis** will be held at the open meeting of the LBTU Doctoral Council for Veterinary Medicine at 13.00 on February 24, 2023 at the Faculty of Veterinary Medicine, 8 Helmana Street, Jelgava, auditorium No A100.

**The doctoral thesis is available** at the Fundamental Library of Latvia University of Life Sciences and Technologies, 2 Liela Street, Jelgava and on the website <http://llufb.llu.lv/en>

You are welcome **to send your comments** to the secretary of Doctoral Council – lecturer, *Mg.med.vet. Anna Krūklīte*, 8 Helmana Street, Jelgava, LV- 3004, Latvia, e-mail: anna.kruklite@lbtu.lv. It is advised to send your comments in scanned form and undersigned.

## SATURS/CONTENT

IEVADS .....	6
1. MATERIĀLS UN METODIKA .....	12
1.1. Pētījuma laiks, vieta un pētījuma shēma .....	12
1.2. Materiāla raksturojums .....	14
1.3. Metodikas apraksts .....	15
1.3.1. Cūku fekāļiju paraugu ieguve septiņās Latvijas cūkkopības saimniecībās .....	15
1.3.2. Sivēnu īdināšanas pētījums un paraugu ieguves metodika .....	16
1.3.3. Paraugu bakterioloģiskā izmeklēšana .....	17
1.3.4. ESBL gēnu noteikšana, izmantojot molekulārās bioloģijas metodes .....	18
1.3.5. Histoloģiskā izmeklēšana .....	19
1.3.6. Imūnhistoķimiskā izmeklēšana .....	20
1.3.7. Augu ēterisko eļļu (EO) kīmiskā satura noteikšana .....	21
1.3.8. Augu ēterisko eļļu (EO) un bagātināto EO antibakteriālās efektivitātes pārbaude .....	21
1.3.9. Datu statistiskā analīze .....	23
2. PĒTĪJUMA REZULTĀTI UN DISKUSIJA .....	24
2.1. Rezistentā un ESBL producējošā <i>E. coli</i> izplatība cūkkopības saimniecībās .....	24
2.2. Probiotiku, griķu kliju un augu komponentu izbarošanas ietekme uz sivēnu vispārīgo un zarnu veselību .....	37
2.3. Ēterisko eļļu (EO) kīmiskā sastāva raksturojums, antibakteriālā darbība un dažādu piedevu ietekme uz EO efektivitāti pret ESBL producējošiem <i>E. coli</i> .....	48
SECINĀJUMI .....	56
PRAKTISKĀS REKOMENDĀCIJAS .....	58
INTRODUCTION .....	59
1. MATERIAL AND METHODOLOGY .....	63
1.1. Study time, place and study scheme .....	63
1.2. Characteristics of the material .....	65
1.3. Methodology description .....	66
1.3.1. Sampling of pig faeces in seven Latvian pig farms .....	66
1.3.2. Piglet feeding study and sampling methodology .....	67
1.3.3. Bacteriological examination of samples .....	68
1.3.4. Detection of ESBL genes using molecular biology techniques .....	70

1.3.5. Histological examination .....	70
1.3.6. Immunohistochemical examination .....	71
1.3.7. Determination of the chemical content of plant essential oils (EO) .....	72
1.3.8. Testing the antibacterial efficacy of plant essential oils (EOs) and enriched EO.....	73
1.3.9. Statistical analysis of data .....	74
<b>2. RESEARCH RESULTS AND DISCUSSION .....</b>	<b>75</b>
2.1. Prevalence of resistant and ESBL-producing <i>E. coli</i> in pig farms .....	75
2.2. Effect of feeding probiotics, buckwheat bran and herbal components on general and intestinal health of piglets .....	83
2.3. Characterization of the chemical composition of essential oils (EO), antibacterial activity and the effect of different supplements on the efficacy of EO against ESBL-producing <i>E. coli</i> .....	90
<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>94</b>
<b>PRACTICAL RECOMMENDATIONS.....</b>	<b>96</b>

## IEVADS

*Escherichia coli* ir fakultatīvi anaeroba baktērija, plaši pārstāvēta zarnu traktā vairumam dzīvnieku sugu. Jauniem dzīvniekiem *E. coli* ir komensiālis – ātri kolonizē zarnu traktu un kļūst par normālās mikrobiotas daļu, taču daļa no *E. coli* celmiem ir patogēni.

Cūkām nozīmīgākie ir enterotoksigēnie *E. coli* (ETEC), enteropatogēnie *E. coli* (EPEC), šiga-toksigēnie *E. coli* (STEC) un ekstraintestināli patogēnie *E. coli* (ExPEC), tai skaitā, septicēmiskie *E. coli* (SEPEC) celmi. Īpaši aktuāla ir kolibakterioze, ko izraisa enterotoksigēnie *E. coli* celmi zīdēj- un atšķirtiem sivēniem. Ātraudzīgus sivēnus skar hemolītiskais (STEC) *E. coli*, kas izraisa sivēnu tūskas slimību. ExPEC un EPEC ir kā oportūniski patogēni un ir daļa no normālās zarnu mikrofloras (Gyles & Fairbrother, 2010).

*E. coli* patogenitāte ir saistīta ar virulences gēniem, kas ir kodēti mobilajos ģenētiskajos elementos (Gyles & Fairbrother, 2010), turklāt būtiska nozīme ir predisponējošiem faktoriem, t.i., pasīvās imunitātes nepietiekamībai, neatbilstošai higiēnai, jaundzimušā dzīvnieka statusam un stresa faktoriem, piemēram, sivēnu atšķiršanas periods un intensīvajai cūkkopībai, kas ir dominējošais saimniekošanas veids gan pasaulei, gan Latvijā. Augsts cūku blīvums un šīs sugas dzīvnieku jutība uz stresa faktoriem veicina slimību koncentrēšanos un transmisiju.

Cūku audzētāji tradicionāli ir centušies uzlabot gremošanas trakta dabiskās aizsargfunkcijas, izmantojot antibiotikas kā augšanas veicinātājus (Cromwell, 2002), taču tas ir sekmējis arī baktēriju rezistenci pret antibakteriālajiem preparātiem (Cantón & Ruiz-Garbajosa, 2011). Gremošanas traktā esošajām *Enterobacteriaceae* dzimtas baktērijām, tostarp *E. coli*, raksturīgs konjugācijas jeb horizontālais rezistences pārvades mehānisms, kas spēj savstarpejī apmainīties ar plazmīdām gan savas sugars robežās, gan arī starp baktēriju sugām. Plazmīdās bieži ir inkorporēti daudzi rezistences gēni, tāpēc baktērijām var ātri veidoties multirezistence (Boerlin & White, 2013).

Pieaugot bažām par antibiotiku rezistento baktēriju globālo izplatību un to radīto risku sabiedrības veselībai, kopš 2006. gada ir aizliegts lietot antibiotikas kā augšanas veicinātājus dzīvniekiem, tostarp, cūkām. Neskatoties uz to, ka Eiropas Savienībā antibiotiku kā augšanas veicinātāju lietošana ir ierobežota, vairāku pētnieku darbi (Bednorz et al., 2013; Haenni et al., 2014; Von Salviati et al., 2014) liecina par augstu rezistentā *E. coli* izplatību un pieaugošo aktualitāti, īpaši lielu uzmanību pievēršot plašināta spektra  $\beta$ -laktamāzes (ESBL) producējošajam *E. coli*, kura izdalītie fermenti hidrolizē un inaktivē vairumu no  $\beta$ -laktāma antibiotikām, tostarp 3. un 4. paaudzes cefalosporīnus, kurus Pasaules Veselības organizācija ir atzinusi kā „kritiski svarīgas antibiotikas humānajā medicīnā”.

Pasaules Veselības organizācija 2014. gada pārskata ziņojumā par antibiotiku rezistenci atklāj, ka tā ir „lielākais globālais drauds” cilvēku veselībai, jo baktēriju rezistence pret antibiotikām arvien pieaug, radot risku „post-„, jeb „pēc antibiotiku ēras” attīstībai, kad cilvēki mirst no vienkāršām infekcijām, kuras bijis iespējams ārstēt desmitiem gadu ilgi (WHO, 2015).

Turklāt, kā ziņo *Global Trends* par antibiotiku lietošanu pārtikā izmantojamajiem dzīvniekiem, vislielākais antimikrobiālo līdzekļu patēriņš uz kilogramu dzīvmasas ir cūkām, apsteidzot vistas un liellopus (Van Boeckel et al., 2015). Vissvarīgākais ir tas, ka rezistentajām baktērijām izdaloties no makroorganisma, tiek piesārņota vide, tādējādi apdraudot citus dzīvniekus un cilvēkus, un, tā kā cūkas ir produktīvie dzīvnieki, pastāv augsts risks rezistentajām baktērijām nokļūt arī pārtikas ļedē (WHO, 2015).

Antibiotiku kā augšanas stimulatoru aizliegums ir radījis nepieciešamību pēc efektīviem alternatīvo līdzekļu risinājumiem (Liu et al., 2018; Stein & Kil, 2006). Mūsu pētījumā tika pievērsta uzmanība probiotiku saturošas papildbarības un augu izcelsmes dzīvnieku barības sastāvdaļu ietekmei ne tikai uz sivēnu un to zarnu veselību, bet arī ietekmei uz rezistentā *E. coli* izplatību fekālijās. Mūsuprāt, ēterisko eļļu antibakteriālās efektivitātes salīdzinājums pret dažāda rezistences līmeņa cūku *E. coli* izolātiem *in vitro* sekmētu to plašākas izmantošanas iespējas rezistento *E. coli* kontrolē.

### Aizstāvamās tēzes:

1. Latvijas cūkkopības saimniecībās ir augsta antibiotiku rezistentā *E. coli* izplatība, turklāt tā būtiski atšķiras starp saimniecībām un cūku vecuma grupām;
2. atsevišķās cūkkopības saimniecībās ir augsta ESBL producējošā *E. coli* sastopamība, bieži tiem novēro plašus multirezistences (MDR) fenotipus;
3. atsevišķiem ESBL kodējošiem gēniem novēro pozitīvas asociācijas ar noteiktu antibiotiku izraisītu fenotipisko rezistenci, turklāt gēna *bla*<sub>CTX-M</sub> klātbūtne nodrošina *E. coli* plašākus MDR fenotipus;
4. dabiskas izcelsmes barības komponenti (probiotikas, probiotikas+griķu klijas, augu piedeva) uzlabo sivēnu un to zarnu veselību – modulējot zarnu mikrobiotu, uzlabojot zarnu glotādas histomorfoloģiskos rādītājus un ietekmējot T limfocītu izplatību tievās zarnas glotādā, Peijera platēs, kā arī augus saturošas barības sastāvdaļas samazina *E. coli* skaitu un tā fenotipiskās rezistences dažādību;
5. Latvijā augu Lamiaceae dzimtas augu ēteriskās eļļas raksturojas ar zemāku antibakteriālo darbību pret cūku komensiālajiem *E. coli* nekā komerciālās ēteriskās eļļas;
6. komerciālo ēterisko eļļu antibakteriālā darbība pret *E. coli* būtiski uzlabojas, bagātinot tās ar kaprilskābi vai 3% NaCl piedevu.

**Promocijas darbā izvirzītā hipotēze:** baktērijas *Escherichia coli* rezistence pret antibiotikām ir augsti izplatīta cūkkopības saimniecībās Latvijā un probiotiku, kā arī augu izcelsmes produktu lietošana varētu ierobežot *E. coli* un ESBL producējošā *E. coli* izplatību.

**Promocijas darba mērķis:** izpētīt rezistentā *Escherichia coli* izplatību cūkām Latvijā, izvērtēt tās samazināšanas iespējas, izmantojot dabiskas izcelsmes barības komponentus un līdzekļus.

#### Mērķa sasniegšanai izvirzītie **promocijas darba uzdevumi:**

1. noskaidrot pret antibiotikām rezistentā *Escherichia coli* izplatību cūkkopības saimniecībās Latvijā. Noteikt paplašināta spektra bēta-laktamāzes (ESBL) producējošā *E. coli* sastopamību cūkām;
2. izvērtēt probiotikas saturošas papildbarības un augu izcelsmes dzīvnieku barības sastāvdaļu ietekmi uz sivēnu un to zarnu veselību – rezistentā *E. coli* izplatību, zarnu mikrobiotu, histomorfologisko un imunoloģisko stāvokli, gaļas kvalitāti;
3. salīdzināt Latvijas un komerciālo ēterisko eļļu antibakteriālo darbību *in vitro* pret cūku fekālajiem paplašināta spektra bēta-laktamāzi (ESBL) producējošiem *E. coli*, kā arī izvērtēt ar kaprīlskābi un nātrijs hlorīdu bagātināto ēterisko eļļu izmantošanu šo rezistento *E. coli* kontrolē.

#### **Pētījuma zinātniskā novitāte:**

1. iegūti oriģināli dati par antibiotiku rezistentā, multirezistentā un paplašināta spektra bēta-laktamāzes (ESBL) producējošā *E. coli* sastopamību cūku audzēšanas saimniecībās Latvijā, to izplatības atšķirībām lielajās un mazajās saimniecībās un dažāda vecuma cūkām;
2. iegūti oriģināli dati par ESBL producējošā *E. coli* fenotipisko rezistenci, kā arī par multirezistences fenotipu izplatību starp ESBL producējošiem *E. coli*, kas izolēti no cūkām Latvijā;
3. noteicām *E. coli* izplatītākos ESBL kodējošos gēnus (*bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> un *bla*<sub>SHV</sub>), to sadalījuma atšķirības lielajās un mazajās cūku saimniecībās;
4. iegūti oriģināli dati par statistiski nozīmīgām asociācijām starp ESBL kodējošajiem gēniem un fenotipiski konstatēto antibiotiku rezistenci cūku fekālajiem *E. coli*;
5. iegūti oriģināli dati par “ProbioHelp” papildbarības, probiotiku+griķu (*Fagopyrum esculentum*) kliju un augu barības sastāvdaļu (*Plantago major*, *Urtica dioica*, *Hypericum perforatum* 1:1:1) ietekmi uz 14-56 dienu vecu sivēnu zarnu saturu un fekāliju mikrobiotas izmaiņām, rezistentā *E. coli* izplatību, tievās un resnās zarnas glotādas struktūru histomorfologiskajiem mērķumiem, kausveida šūnu skaitu un to sekretētajiem mucīniem, epitēlijā ūnu proliferāciju (Ki67) un T limfocītu (CD3 pozitīvo ūnu) infiltrāciju tievās

- un resnās zarnas glotādas, zemglotādas un Peijera plašu struktūrās, kā arī noteikta ietekme uz taukskābju saturu muskuļaudos;
6. pirmo reizi Latvijā noteikta un salīdzināta komerciāli pieejamo un Latvijā augušu augu (*T. serpyllum*, *T. vulgaris* un *S. montana*) ēterisko eļļu antibakteriālā efektivitātē pret komensiālo *E. coli*, kas izolēts no cūkām; vērtēta šo ēterisko eļļu ķīmiskā sastāva ietekme uz antibakteriālo darbību;
  7. pirmo reizi izvērtēta ar kaprilskābi un 3% NaCl bagātināto komerciālo ēterisko eļļu (*T. serpyllum*, *T. vulgaris* un *S. montana*) antibakteriālā darbība pret komensiālo *E. coli*, kas iegūts no cūkām; noteikta šo kombināciju antibakteriālā efektivitātē pret dažādiem *E. coli* rezistences līmeniem (ESBL producējošiem/ne-producējošiem *E. coli* un multirezistentiem/ne-multirezistentiem *E. coli*).

### **Personīgais ieguldījums:**

1. fekaliju paraugu bakterioloģiskā izmeklēšana (komensiālās indikatorbaktērijas *E. coli* izolēšana un bioķīmiskā apstiprināšana; paraugu testēšana uz ESBL producējošā *E. coli* klātbūtni, to fenotipiskā apstiprināšana; *E. coli* un ESBL producējošiem *E. coli* antimikrobiālās jutības (antibiotiku rezistences) noteikšana attiecīgi pret 12 un 18 antibiotikām, izolēto kultūru sagatavošana ilgstošai uzglabāšanai);
2. ārstniecības augu ievākšana, to saturošas augu piedevas sagatavošana sivēnu ēdināšanas pētījuma realizēšanai;
3. iegūto sivēnu fekāliju un zarnu satura bakterioloģiskā izmeklēšana (*Enterobacteriaceae*, *E. coli* un *Lactobacillus* spp. skaita noteikšana, *E. coli* izolēšana un tā antimikrobiālās jutības (antibiotiku rezistences) noteikšana;
4. savvalas un Latvijā audzēto ārstniecības augu (*T. vulgaris*, *T. serpyllum* un *S. montana*) ievākšana, ēterisko eļļu ekstrahēšana, izmantojot hidrodestilācijas metodi;
5. Latvijas un komerciālo ēterisko eļļu, kā arī komerciālo bagātināto (ar kaprilskābi un NaCl) ēterisko eļļu antibakteriālās darbības pārbaude *in vitro*.

### **Pētījuma rezultātu aprobācija / Approbation of the research results**

Zinātniskās publikācijas **žurnālos** / Scientific publications in **journals** (indeksētas/indexed by SCOPUS/Web of SCIENCE):

1. **Gāliņa D.**, Radenkovs V., Kviesis J., Valdovska A. Effect of Essential Oils Supplemented with Caprylic Acid and Sodium Chloride against Faecal ESBL-Producing *Escherichia coli* Isolated from Pigs. *Antibiotics*, 2022, 11(4), 461. (*Q2 ranga zinātniskais žurnāls*)
2. **Gāliņa D.**, Balins A., Valdovska A. The Prevalence and Characterization of Fecal Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolated from Pigs on Farms of Different Sizes in Latvia. *Antibiotics*, 2021, 10(9), 1099. (*Q2 ranga zinātniskais žurnāls*)

3. **Gāliņa D.**, Ansonska L., Valdovska A. Effect of probiotics and herbal products on intestinal histomorphological and immunological development in piglets. *Veterinary Medicine International*, 2020, 3461768. (*Q2 ranga zinātniskais žurnāls*)

Publikācijas **konferenču zinojumu izdevumos / Publications in conference proceedings** (indeksēti/indexed by SCOPUS/Web of SCIENCE):

4. **Gāliņa D.**, Valdovska A. Effect of probiotics and herbals on health and shedding of resistant *Escherichia coli* in piglets. Research for rural development 2017, annual 23rd international scientific conference proceedings, 2017,1, 251.-258. (*Web of Science raksts*)
5. Valdovska A., **Gāliņa D.**, Krasnova I., Segliņa D. Antibacterial activity of some plants of traditional herbal medicine in vitro against *Escherichia coli* originated from Liquid pig manure. ACM's International Conference Proceedings Series 2017, Part F127267, 56-61. (*Scopus raksts*)

Publikācijas **citā žurnālā / Publications in another journal:**

6. Valdovska A., **Gāliņa D.** Ārstniecības augi un probiotikas kā antibiotiku alternatīva. *AgroTops*. 2017,2, 67.-69. (*Populārzinātniskais raksts*)

Tēzes **konferenču rakstu krājumos/Theses in conference proceedings:**

7. **Gāliņa D.**, Tračevska T., Valdovska A. The antimicrobial activity of eight essential oils against ESBL *Escherichia coli* isolated from pigs. Medicina. Vol. 55(1): International Scientific Conference on Medicine: 77 International Scientific Conference of the University of Latvia. 2019, 119. (*Kopsavilkums*)
8. **Gāliņa D.**, Valdovska A. Challenge of the probiotics on growth performance and intestinal health in piglets. 26th NJF congress "Agriculture for the next 100 years": programme and summaries of presentation, 2018, 98. (*Kopsavilkums*)
9. Jonkus D., Ilgaža A., Valdovska A., Liepa L., Paura L., Degola L., Cielava L., Petrovska S., Smiltiņa D., Ruska D., Klaviņa I., Viduža M., **Gāliņa D.**, Jonova S., Gatiņa L., Kovalenko K., Ilgažs A. Vietējās izcelsmes slaucamo govju un cūku saimnieciski nozīmīgo pazīmju ģenētiskā izpēte kvalitatīvu pārtikas produktu ražošanai. IV Pasaules latviešu zinātnieku kongress: tēzes, 2018; 24.-25. (*Kopsavilkums*)
10. **Gāliņa D.**, Valdovska A. Comparison of a mixture of probiotics and its combination with buckwheat bran and herbals for piglet immune system, intestinal microflora and prevalence of resistant *Escherichia coli*. International scientific conference on Probiotics and Prebiotics: proceedings, 2016, 94-95. (*Kopsavilkums*)
11. **Gāliņa D.**, Valdovska A. Impact of zinc feed supplementation of piglets to the proportion of multidrug resistant *Escherichia coli*. VI International

Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology – BioMicroWorld2015: book of abstracts, 2015, 345. (*Kopsavilkums*)

**Ziņojumi zinātniskajās konferencēs/Reports at scientific conferences:**

1. **Gāliņa, D.**, Tračevska T., Valdovska A. The antimicrobial activity of eight essential oils against ESBL *Escherichia coli* isolated from pigs. International Scientific Conference on Medicine: 77 International Scientific Conference of the University of Latvia, 22. februāris, 2019. gads, Rīga, Latvija. (*stenda ziņojums*)
2. **Gāliņa D.**, Valdovska A. Challenge of the probiotics on growth performance and intestinal health in piglets. 26th NJF congress "Agriculture for the next 100 years", 27-29. jūnijis, 2018. gads, Kauņa, Lietuva. (*stenda ziņojums*)
3. Jonkus D., Ilgaža A., Valdovska A., Liepa L., Paura L., Degola L., Cielava L., Petrovska S., Smiltiņa D., Ruska D., Klaviņa I., Viduža M., **Gāliņa D.**, Jonova S., Gatiņa L., Kovalenko K., Ilgažs A. Vietējās izcelsmes slaucamo govju un cūku saimnieciski nozīmīgo pazīmju ģenētiskā izpēte kvalitatīvu pārtikas produktu ražošanai. IV Pasaules latviešu zinātnieku kongress, 18.-20. jūnijis, 2018. gads, Rīga, Latvija. (*stenda ziņojums*)
4. **Gāliņa, D.**, Valdovska A. Effect of probiotics and herbals on health and shedding of resistant *Escherichia coli* in piglets. Research for rural development 2017: annual 23rd international scientific conference, Latvia University of Agriculture, 17-19. maijs, 2017. gads, Jelgava, Latvija. (*mutisks ziņojums*)
5. Valdovska, A., **Gāliņa D.**, Krasnova I., Segliņa D. Antibacterial activity of some plants of traditional herbal medicine in vitro against *Escherichia coli* originated from Liquid pig manure. 7th International conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics (ICBBB 2017), 21.-23. janvāris, 2017. gads, Bangkoka, Taizeme. (*mutisks ziņojums*)
6. **Gāliņa D.**, Valdovska A. Comparison of a mixture of probiotics and its combination with buckwheat bran and herbals for piglet immune system, intestinal microflora and prevalence of resistant *Escherichia coli*. International scientific conference on Probiotics and Prebiotics, 21.-23. jūnijis, 2016. gads, Budapešta, Ungārija. (*stenda ziņojums*)
7. **Gāliņa D.**, Valdovska A. Impact of zinc feed supplementation of piglets to the proportion of multidrug resistant *Escherichia coli*. VI International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology – BioMicroWorld2015, University of Barcelona Barselona, 28.-30. oktobris, 2015. gads, Barselona, Spānija. (*stenda ziņojums*)

**Patents/Patent:**

WIPO/PCT patents WO 2019/229507 A1 "Pig feed additive for prophylaxis of antibiotic-resistant *E. coli*". (starptautiskā publicēšanas diena 05.12.2019.) (Patent Cooperation Treaty Application)

# **1. MATERIĀLS UN METODIKA**

## **1.1. Pētījuma laiks, vieta un pētījuma shēma**

Promocijas pētījums izstrādāts trijās aktivitātēs laika posmā no 2014. līdz 2022. gadam – LLU Veterinārmedicīnas fakultātes Pārtikas un Vides higiēnas institūtā un LLU Biotehnoloģiju zinātniskās laboratorijas Molekulārās bioloģijas un mikrobioloģijas nodaļā.

Lai noteiktu pret antibiotikām rezistentā un ESBL producējošā *E. coli* izplatību cūkām, Pirmajā pētījuma aktivitātē ieguvām cūku fekāliju paraugus septiņās cūku audzēšanas saimniecībās trīs Latvijas reģionos – Vidzemes, Pierīgas un Zemgales. Paraugu bakterioloģisko un molekulārbioloģisko izmeklēšanu veicām LLU Biotehnoloģiju zinātniskās laboratorijas Molekulārās bioloģijas un mikrobioloģijas nodaļā (LLU BZL MBMN).

Lai izvērtētu rezistentā un ESBL producējošā *E. coli* samazināšanas iespējas cūkkopības saimniecībās, tika realizētas vēl divas aktivitātes – sivēnu ēdināšanas pētījums (Otrā aktivitāte) un aktīvo vielu komponentu izstrāde potenciāliem vides apstrādes līdzekļiem (Trešā aktivitāte).

Otrajā pētījuma aktivitātē, vienā cūkkopības saimniecībā Pierīgas reģionā, realizējām sivēnu ēdināšanas pētījumu. Sivēniem izēdinājām trīs dažādus dabiskas izeelsmes barības komponentus – probiotikas saturošu papildbarību “ProbioHelp” (turpmāk tekstā – probiotikas), probiotikas+grīķu klijas un augu piedevu. Aktivitātes laikā iegūtajos asins paraugos noteicām hematoloģiskos un bioķīmiskos rādītājus LLU Veterinārās klīnikas laboratorijā. Sivēnu fekāliju un gremošanas satura paraugu bakterioloģisko izmeklēšanu veicām LLU BZL MBMN. Audu histoloģiskie preparāti tika sagatavoti LLU Veterinārmedicīnas fakultātes Prekliniskā institūta Salīdzinošās patoloģijas laboratorijā, bet audu imūnhistoķīmiskie preparāti tika sagatavoti Rīgas Austrumu Klīniskās Universitātes Slimnīcas Patoloģijas centrā. Histoloģisko preparātu histopatoloģiskā izvērtēšana tika veikta Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskā institūta “BIOR” Mikrobioloģijas un patoloģijas laboratorijā. Audu griezumu histomorfoloģiskos mērījumus un imūnhistoķīmisko izvērtēšanu veicām LLU BZL MBMN. Taukskābju saturs cūku muskulatūrā noteikts zinātniskā institūta “BIOR” ķīmijas laboratorijā.

Trešajā pētījuma aktivitātē ieguvām savvaļā augušu un Latvijā audzēto augu ēteriskās eļļas (EO) Latvijas Valsts Mežzinātnes institūta “Silava” Meža izejvielu pārstrādes laboratorijā, savukārt augu EO ķīmiskais sastāvs tika noteikts LLU Biotehnoloģiju zinātniskās laboratorijas Agronomisko analīžu nodaļā. Komerciālo un pašu autoru iegūto EO un bagātināto komerciālo EO antibakteriālās efektivitātes pārbaudi veicām LLU BZL MBMN.

**Pētījuma shēma un aktivitāšu raksturojums.** Pirmās pētījuma aktivitātes laikā (2015.-2018. gads) noteicām rezistentā un ESBL producējošā

*E. coli* izplatību cūkām. Kopumā apsekojām 7 cūkkopības saimniecības, veicām to anketēšanu un ieguvām 615 cūku **feķāļiju** paraugus. Paraugus izmeklējām bakterioloģiski – izolējām komensiālo indikatorbaktēriju *E. coli* (n=615), noteicām tā jutību pret 12 antibiotikām un visus feķāļiju paraugus (n=615) testējām uz paplašinātā spektra  $\beta$ -laktamāzes (ESBL) producējošā *E. coli* klātbūtni. Aizdomīgajiem ESBL producējošajiem *E. coli* (n=144) veicām fenotipisko apstiprināšanu un, izmantojot stratificētās nejausības paraugu atlases metodi, atlasījām 50 ESBL *E. coli* izolātus, lai, izmantojot molekulāri-bioloģiskās metodes, noteiku ESBL kodējošo gēnu *bla* (TEM, SHV, CTX-M) klātbūtni. Apstiprinātajiem ESBL producējošajiem *E. coli* (n=50) noteicām jutību pret 18 antibiotikām.

**Otrs pētījuma aktivitātes** laikā (2015.-2017. gads) veicām trīs dabiskas izcelsmes barības komponentu (probiotiku, probiotiku+griķu kliju un augu piedevu) iegādi/sagatavošanu (kas uzrādītu antibiotikām līdzvērtīgus pozitīvos efektus un ļautu aizvietot antimikrobiālos līdzekļus barības devā sivēniem) un sekojošu to izēdināšanu sivēniem no 14. līdz 56. dzīves dienai.

Sivēnu ēdināšanas pētījuma laikā tika iegūti **asins paraugai** (n=50), veikta to hematoloģiskā un bioķīmiskā izmeklēšana. Bakterioloģiski izmeklējām feķāļiju, rektālos un gremošanas satura paraugus. **Feķāļiju** paraugos (n=93) noteicām *E. coli* un *Enterobacteriaceae* skaitu log kvv g<sup>-1</sup>. **Rektālajos** paraugos (n=46) izolējām *E. coli* (n=80) un noteicām tā rezistenci pret 12 antibiotikām. Savukārt zarnu (*jejunum* un *colon*) **gremošanas saturai** paraugos (n=28) noteicām *E. coli*, *Enterobacteriaceae* un *Lactobacillus* spp. skaitu log kvv g<sup>-1</sup>.

**Zarnu** (*jejunum* un *colon*) **audu** (n=28) griezumus (n=280) izmeklējām histoloģiski (n=168) un imūnhistoķīmiski (n=112). Tika izvērtēts zarnu histopatoloģiskais stāvoklis, iegūti zarnu histomorfoloģiskie mērījumi – kriptu dzīlums (CD), bārkstiņu augstums (VH), bārkstiņu platum (VW), VH:CD attiecība, kausveida šūnu (GC) skaits un blīvums, neitrālo un skābo mukopolisaharīdu saturošu GC skaits un blīvums. Imūnhistoķīmiski noteicām Ki67+ un CD3+ šūnu skaitu un relatīvo biežumu dažādās tievās un resnās zarnas struktūrās. Lai noteiku nepiesātināto un piesātināto taukskābju saturu muskuļaudos, tika noteikts taukskābju saturs **galas** paraugos (n=8), izmantojot gāzu hromatogrāfijas metodi.

Lai sekmētu rezistētā *E. coli* samazināšanas iespējas cūkkopības saimniecību vidē, izmantojot augu izcelsmes līdzekļus, **Trešās pētījuma aktivitātes** laikā (2018.-2022. gads), veicām aktīvo vielu komponentu izstrādi potenciāliem vides apstrādes līdzekļiem. Ar hidrodestilācijas metodi ieguvām augu ēteriskās eļļas (EO) (n=3) no Latvijā augušiem ārstniecības augiem, kā arī iegādājāmies komerciāli pieejamos analogus (n=3). Sekojoši noteicām EO (n=6) ķīmisko sastāvu, izmantojot gāzu hromatogrāfijas metodi. Visām EO noteicām antibakteriālo aktivitāti un savstarpēji salīdzinājām to darbības efektivitāti *in vitro* pret dažāda rezistences līmeņa ESBL producējošiem *E. coli*, kas izolēti no

cūku fekālijām Pirmās pētījuma aktivitātes laikā. Noteicām un salīdzinājām komerciālo un bagātināto (ar kaprilskābi, NaCl) komerciālo EO antibakteriālo darbību, kas sekmētu šo dabiskās izcelsmes līdzekļu praktisko izmantošanu rezistento *E. coli*, tostarp ESBL-*E. coli* samazināšanai cūkkopības industrijā.

## 1.2. Materiāla raksturojums

**Cūkkopības saimniecību raksturojums.** Lai noskaidrotu pret antibiotikām rezistentā *E. coli* izplatību cūkām Latvijā un iegūtu fekāliju paraugus (n=615), Pirmās pētījuma aktivitātes laikā apsekojām septīnas cūkkopības saimniecībās ar noslēgtu ražošanas ciklu, četras (L1, L2, L3 un L4; n=465) no tām tika uzskatītas kā lielas (sivēnmāšu skaits 700-2100) un trīs (S1, S2 un S3; n=150) kā mazas (sivēnmāšu skaits 15-40). Aptaujas veidā ieguvām informāciju par cūkkopības saimniecību raksturojumu, diarejas aktualitāti sivēniem, ārstēšanu un profilaksi.

**Sivēnu barības komponentu raksturojums.** Lai izvērtētu dažādu dabiskas izcelsmes barības komponentu – probiotikas saturošas papildbarības un augu izcelsmes dzīvnieku barības sastāvdaļu ietekmi uz zarnu mikrobiotas modulāciju, rezistentā *E. coli* izplatību, cūku un to zarnu veselību, Otrās pētījuma aktivitātes (sivēnu ēdināšanas pētījuma) realizēšanai izmantojām sekojošas barības sastāvdaļas:

- 1) *augu piedeva* – atļautu augu izcelsmes dzīvnieku barības sastāvdaļa – pulverveida viela, ko sagatavojām no 2015. gada jūlijā ievāktiem ārstniecības augiem (lielās ceļtekas (*Plantago major* L.), lielās nātres (*Urtica dioica* L.) un divšķautņu asinszāles (*Hypericum perforatum* L.)) lakstiem, attiecībā 1:1:1 (turpmāk tekstā – augu piedeva).
- 2) *griķu klijas* – augu izcelsmes barības sastāvdaļa, kas izgatavota no griķiem (*Fagopyrum esculentum* L.). Griķu klijas iegādājāmies no komerciālā ražotāja Z/s “Bebri” (turpmāk tekstā – griķu klijas).
- 3) *probiotikas*. Kā probiotiskas izmantojām komerciāli pieejamo probiotikas saturošu papildbarību “ProbioHelp” (1mL satur: *Bacillus subtilis* ATCC PTA 6737 –  $7.42 \cdot 10^4$  kvv; *Bacillus subtilis* DSM 15544 –  $2.2 \cdot 10^6$  kvv; *Saccharomyces cerevisiae* NCYC Sc47 –  $7.0 \cdot 10^3$  kvv; *Lactobacillus casei* ATCC7469 –  $6.0 \cdot 10^3$  kvv; *Lactobacillus plantarum* CNCM I-3235 –  $2.0 \cdot 10^5$  kvv; *Lactococcus lactis* NCIMB 30117 –  $4.0 \cdot 10^5$  kvv; *Saccharomyces cerevisiae* IFO 0203 –  $7.0 \cdot 10^3$  kvv) (turpmāk tekstā – probiotikas).

**Ēdināšanas pētījuma sivēnu grupu raksturojums.** Sivēnu ēdināšanas pētījums (Otrā pētījuma aktivitāte) tika realizēts vienā cūkkopības saimniecībā – L3, kur tika veikta augstākminētās probiotikas un atļauto augu izcelsmes dzīvnieku barības sastāvdaļu izēdināšana sivēniem. Pētījumam atlasījām četrus metienus, kuros bija sivēnmātes ar 14 dienu veciem Landrases un Djurokas

Šķirnes krustojuma sivēniem (n=44), ar vidējo dzīvmasu  $4.96 \pm 0.13$  kg. Katra metiena sivēnus tālāk iedalījām pētnieciskajās grupās – t.i., kontroles grupa (C grupa, n=11), probiotiku grupa (P grupa, n=11), probiotiku un griķu kliju grupa (PB grupa, n=11) un ārstniecības augu grupa (H grupa, n=11). Pētījuma laikā pie dzeramā ūdens P un PB grupai pievienojām probiotikas noteiktā koncentrācijā, savukārt, PB grupai vēl papildus pie pamatbarības noteiktā koncentrācijā pievienojām klāt griķu klijas. H grupai pie pamatbarības pievienojām augu piedevu noteiktā koncentrācijā. Pētījuma periods bija 6 nedēļas, t.i., no 14. līdz 56. sivēnu dzīves dienai. Ēdināšanas pētījuma gaita aprakstīta 1.3.2. apakšnodalā.

**Ēterisko eļļu (EO) raksturojums.** Lai izvērtētu rezistentā *E. coli* un ESBL producējošā *E. coli* samazināšanas iespējas, izmantojot augu izcelsmes līdzekļus – EO, Trešās pētījuma aktivitātes laikā ieguvām Latvijā augu EO un to analogus, kas pieejami komerciālajā tirgū.

EO ieguvām no 2019. gada jūlijā ievāktiem Latvijā augušiem ārstniecības augiem – (mazā mārsila (*Thymus serpyllum* L.), parastā timiāna (*Thymus vulgaris* L.) un kalnu pupumētras (*Satureja montana* L.) lakstiem, izmantojot hidrodestilācijas metodi. Komerciāli iegādājāmies trīs EO: mazais mārsils (*Thymus serpyllum* L.), ražotājs “Primavera” (Vācija), izcelsmes valsts – Turcija; parasta timiāns (*Thymus vulgaris* L.), ražotājs “Oils4life” (Apvienotā Karaliste) izcelsmes valsts – Spānija; kalnu pupumētra (*Satureja montana* L.), izplatītājs “Hermitage Oils”, izcelsmes valsts – Horvātija. Saskaņā ar izplatītāja sniegtu informāciju, visas komerciālās EO ir iegūtas ar tvaika destilācijas metodi.

### 1.3. Metodikas apraksts

#### 1.3.1. Cūku fekāliju paraugu ieguve septiņās Latvijas cūkkopības saimniecībās

**Pirmās pētījuma aktivitātes laikā** no septiņām cūkkopības saimniecībām kopumā ieguvām 615 fekāliju paraugus no 4 (n=110), 6 (n=151), 8 (n=105), 12 (n=87), 20 (n=85) nedēļu vecām cūkām un sivēnmātēm (n=77) pēc nejaušības principa, atlasot divus līdz četrus paraugus no cūku sprosta, atkarībā no apstākļiem, t.i., tūlīt pēc defekācijas vai izvēloties pēc iespējas svāigākas fekāliju masas no sprosta grīdas. Paraugos izolējām *E. coli* un noteicām ESBL producējošā *E. coli* klātbūtni, sekojoši noteicām izolēto kultūru jutību pret antibiotikām. ESBL producējošiem *E. coli* tika noteikta ESBL kodējošo gēnu klātbūtne. Iegūto paraugu izmeklēšanai pielietoto metodiku skatīt 1.3.3. (Paraugu bakterioloģiskā izmeklēšana) un 1.3.4. (ESBL gēnu noteikšana, izmantojot molekulārās bioloģijas metodes) apakšnodalās.

### **1.3.2. Sivēnu ēdināšanas pētījums un paraugu ieguves metodika**

**Otrs pētījuma aktivitātes laikā**, saimniecībā L3, veicām probiotikas saturošas papildbarības un augu izcelsmes barības sastāvdaļu izēdināšanu sivēniem no 14. līdz 56. dzīves dienai. Līdz sivēnu 28. dzīves dienai (atšķiršanai), katras pētnieciskās grupas sivēnus turējām kopā ar sivēnmāti atnešanās sprostā. Pēc atšķiršanas, sivēnus pārvietojām uz atšķirto sivēnu istabu un pētījums turpinājās tādās pašās pētnieciskajās grupās līdz sivēni bija sasniegusi 56 dienu vecumu.

**C grupas sivēni** saņēma pamatbarību un pirmās divas nedēļas pēc atšķiršanas – pamatbarību ar  $1000 \text{ mg ZnO kg}^{-1}$  piedevu. **P grupas sivēni** saņēma pamatbarību un probiotikas, kuras pievienojām dzeramajam ūdenim noteiktā koncentrācijā (1%, 0.75%, 0.45%, 0.34%, 0.32%) atbilstoši sivēnu vecumam (14., 28., 35., 42., 49. dzīves diena). **PB grupas** sivēni saņēma pamatbarību un griķu klijas 3% apmērā no tās masas. Kopā ar dzeramo ūdeni saņēma probiotikas noteiktā koncentrācijā (1%, 0.75%, 0.45%, 0.34%, 0.32%) atbilstoši sivēnu vecumam (14., 28., 35., 42., 49. dzīves diena). **H grupas** sivēni saņēma pamatbarību ar ārstniecības augu piedevu 1.5% apmērā no tās masas. Sivēnu pamatbarības receptūra atbilda sivēnu vecumam un fizioloģiskajām vajadzībām. Sivēni barību un ūdeni saņēma *ad libitum*.

Sivēnu barošanai izmantojām pārvietojamās plastikāta barotavas, bet probiotiku dozēšanai – medikatoru “Lubing” (Lubing Maschinenfabrik, Vācija).

**Asins paraugus** ( $n=50$ ) ieguvām no katra dzīvnieka pirmajā (sivēnu 14. dzīves dienā) un pēdējā (56. dzīves dienā) pētījuma dienā ar vakuumstobriju, kuram pievienota adata vai ar slīrces palīdzību no *v. jugularis externa* / *v. brachialis*. Hematoloģiski asins paraugos noteicām kopējo leikocītu, eritrocītu, granulocītu, limfocītu skaitu, haematokrītu, hemoglobīnu, vidējo eritrocītu tilpumu, vidējo hemoglobīna saturu eritrocītos un vidējo hemoglobīna koncentrāciju eritrocītos, izmantojot veterināro hematoloģisko analizatoru (Exigo Eos, Boule Medical AB, Zviedrija). Serumā noteicām glikozi, kalciju, fosforu, gamma-glutamiltransferāzi, sārmaino fosfotāzi un aspartātaminotransferāzi, izmantojot klinisko ķīmijas analizatoru (Mindray BS-200E, Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd., Ķīna).

**Fekāļu paraugus** ( $n=93$ ) ieguvām sivēnu 14. ( $n=13$ ), 35. ( $n=37$ ) un 56. ( $n=43$ ) dzīves dienā tūlīt pēc to izkārnīšanās. Bakterioloģiski noteicām *E. coli* un *Enterobacteriaceae* skaitu ( $\log \text{kvv g}^{-1}$ ). **Rektālos paraugus** ( $n=46$ ) ieguvām no sivēnu taisnās zarnas ar sterila vates aplikatora palīdzību sivēnu 14. ( $n=12$ ) un 56. dzīves dienā ( $n=34$ ). Bakterioloģiski izolējām *E. coli* un sekojoši noteicām tā jutību pret antibiotikām, izmeklēšanas metodiku skatīt 1.3.3. apakšnodalā.

Pētījuma beigās (sivēnu 56. dzīves dienā) pēc nejaušības principa atlasiņām četrus sivēnus no katras pētnieciskās grupas un divus sivēnus no C

grupas (n=14) un tie tika nokauti saimnieciskā nolūkā atzītā kautuvē. **Gremošanas satura paraugus** ieguvām no tievās zarnas (*intestinum tenuae*) tukšās (*jejunum*) zarnas daļas (20 cm proksimāli no gūžas zarnas un aklās zarnas vēderplēves krokas (*plica ileocaecalis*)) un resnās zarnas (*intestinum crassum*) lokzarnas (*colon*) lejupejošās daļas (*colon descendens*). Gremošanas saturā noteicām *E. coli*, *Enterobacteriaceae* un *Lactobacillus* spp. skaitu (log  $\text{kvv g}^{-1}$ ), bakterioloģisko izmeklēšanas metodiku skatīt 1.3.3. apakšnodalā. **Audu paraugus** histoloģiskai izmeklēšanai (1.5-2 cm apjomā) ieguvām no tukšās zarnas (*jejunum*), 20 cm proksimāli no gūžas zarnas un aklās zarnas vēderplēves krokas (*plica ileocaecalis*) un resnās zarnas (*intestinum crassum*) lokzarnas (*colon*) lejupejošās (*colon descendens*) proksimālās daļas. Iegūtos audu paraugus fiksējām 10% neitrālā buferētā formalīna šķidumā, paraugu histoloģisko un imūnhistokīmisko izmeklēšanas metodiku skatīt 1.3.5. un 1.3.6. apakšnodalā.

**Muskuļaudu paraugus** (n=8) ieguvām no garākā muskuļa jostas un krūšu daļas (*m. Longissimus thoracis et lumborum*) un noteicām nepiesātināto un piesātināto taukskābju saturu, izmantojot gāzu hromatogrāfijas metodi, saskaņā ar instrukciju BIOR-T012-131-2011.

### 1.3.3. Paraugu bakterioloģiskā izmeklēšana

Cūku fekāliju paraugiem (n=615) (Pirmā aktivitāte) un sivēnu rektālajiem (n=46), fekāliju (n=93) un gremošanas satura (n=28) paraugiem (Otrā aktivitāte) veicām bakterioloģisko izmeklēšanu.

*E. coli* izolēšana un ESBL producējošā *E. coli* klātbūtnes noteikšana fekāliju paraugos. Lai izolētu *E. coli* no fekāliju (n=615) un rektālajiem (n=46) paraugiem, izmantojām Levina eozīna metilēnzilā agaru (Levine EMB Blue Agar, Biolife), bet, lai noteiktu fekāliju (n=615) un sivēnu rektālajos (n=46) paraugos ESBL producējošā *E. coli* klātbūtni – izmantojām selektīvi diferenciālo barotni – Hromogēno ESBL agaru (Chromart ESBL Agar, Biolife). Izolētajām aizdomīgajām *E. coli* kultūrām veicām bioķīmisko testu pārbaudi, izmantojot oksidāzes (Oxidase Reagent Droppers, BD), ureāzes (Urea Agar (Christensen), Biolife), citrātu (Simmons Citrate agar, Oxoid) un indola (Tryptophan Peptone Water, Sifin; Kovacs` reagent, Biolife) testus.

Fenotipiskais apstiprinošais tests ESBL producēšanai. Saskaņā ar EUCAST ieteikumiem (EUCAST, 2017b) aizdomīgo ESBL producējošo *E. coli* (n=144) apstiprināšanai, izmantojām kombinēto disku testu un to izpildījām saskaņā ar CLSI vadlīnijām (CLSI, 2018b).

*E. coli* un ESBL *E. coli* jutības noteikšana pret antibiotikām. Gan Pirmās, gan Otrās aktivitātes laikā izolētajiem *E. coli* noteicām jutību pret 12 antibakteriāliem līdzekļiem (ampicilīnu, amoksicilīnu+klavulānskābī, cefazolīnu, cefotaksīmu, imipenēmu, sulfameoksazola+trimetoprimu,

trimetoprimu, gentamicīnu, hloramfenikolu, tetraciklinu, enrofloksacīnu, ciprofloksacīnu (BD BBL Sensi-Disc, ASV)) saskaņā ar disku difūzijas metodi (EUCAST, 2017a). ESBL producējošajiem *E. coli* (n=50) bez jau minētajām 12 antibiotikām, papildus noteicām jutību vēl pret sešām (mecilīnu, tikarcilīnu, cefaleksīnu, cefoksīnu, cefepimiu) antibiotikām.

Multirezistento *E. coli* noteikšana. Visus *E. coli* izolātus, kuriem noteicām jutību pret antibiotikām, izvērtējām atbilstībai multirezistentās baktērijas statusam (Magiorakos et al., 2012), bet to klasificēšanu līmeņos veicām saskaņā ar Jahanbakhsha norādījumiem (Jahanbakhsh et al., 2016).

ESBL producējošo *E. coli* identificēšana ar MALDI-TOF tehnoloģiju. Fenotipiski apstiprinātos ESBL producējošos *E. coli* izolātus (n=50), identificējām/pārapstiprinājām, izmantojot VITEK MS (bioMerieux SA, Francija) identificēšanas sistēmu, kas balstās uz MALDI-TOF tehnoloģiju.

*Enterobacteriaceae* dzimtas, *E. coli* un *Lactobacillus* spp. skaita noteikšana. Sivēnu gremošanas saturā paraugos (n=28) noteicām *Enterobacteriaceae*, *E. coli* un *Lactobacillus* spp. skaitu, savukārt sivēnu fekāliju paraugos (n=93) noteicām *Enterobacteriaceae* un *E. coli* skaitu. Sākotnējo suspensiju un sērijevida decimālšķidumus sagatavojām saskaņā ar LVS EN ISO 6887-1:1999 standarta prasībām. ***Enterobacteriaceae* dzimtas** baktēriju izolēšanu un uzskaitīšanu veicām saskaņā ar LVS EN ISO 21528-2:2007 standarta prasībām. ***E. coli*** izolēšanau un uzskaitīšanu veicām saskaņā ar LVS EN ISO 16649-2:2007 standarta prasībām. Lai izolētu un uzskaitītu ***Lactobacillus* spp.**, izmantojām MRS agaru ar polisorbāta 80 piedevu (MRS agar with Tween® 80, Biolife) un izmeklēšanu veicām saskaņā ar ražotāja ieteikumiem. Lai aprēķinātu *Enterobacteriaceae*, *E. coli* un *Lactobacillus* spp. skaitu vienā gramā parauga, izmantojām LVS EN ISO 8199:2019 standarta ieteikumus. Rezultātus izteicām kā  $\log_{10}$  kvv g<sup>-1</sup>.

### 1.3.4. ESBL gēnu noteikšana, izmantojot molekulārās bioloģijas metodes

Lai identificētu ESBL gēnu *bla* (*blaCTX-M*, *blaTEM*, *blaSHV*) klātbūtni ESBL producējošajiem *E. coli*, izmantojām polimerāzes kēdes reakciju (PCR).

Sākotnēji no 18±2 h vecas fenotipiski apstiprinātas ESBL producējošas *E. coli* tūrkultūras tika veikta DNS izdalīšana, izmantojot E.Z.N.A. baktēriju DNS izolēšanas komplektu (Omega Bio-tek, ASV), nemot vērā ražotāja protokolu. Izdalītā DNS daudzums tika kontrolēts, izmantojot ND-1000 spektrofotometru. PCR reakcija tika veikta, izmantojot HotStarTaq®Plus Master Mix komplektu (QIAGEN, Vācija) saskaņā ar ražotāja norādījumiem un izmantojot sekjošus ESBL gēnu praimerus (J. Kim et al., 2009):

- 1) TEM – F: (5'-AGTGCTGCCATAACCATGAGTG-3') un TEM R: (5'-CTGACTCCCCGTCTGTAGATA-3');
- 2) SHV – F: (5'-GATGAACGCTTCCCATGATG-3') un SHV R: (5'-CGCTGTTATCGCTCATGGTAA-3');
- 3) CTX M 1. grupa – F: (5'-TCCAGAATAAGGAATCCCATGG-3') un CTX M 1. grupa R: (5'-TGCTTTACCCAGCGTCAGAT-3').

DNS amplicēšanas reakcijai izmantoja termisko ciklistu ABI2770 (Applied Biosystems, ASV). PCR reakcijas noslēgumā, amplicēto DNS sadalīja, izmantojot elektroforēzi 2% agarozes gēlā. DNS fragmentu pozīcijas gēlā noteica, apskatot elektroforēzes gēlu transiluminatorā ultravioletajā starojumā. Kā DNS izmēra markieris tika izmantots 50 bp markieris (GeneRuler 50 bp DNA Ladder, Thermo Scientific, SM0371). TEM pozitīvie izolāti bija 431 bp gari, SHV – 214 bp gari, bet CTX M – bija 621 bp gari.

### **1.3.5. Histoloģiskā izmeklēšana**

Paraugu sagatavošana histoloģiskajai izmeklēšanai. Fiksētos audu (*jejunum* un *colon* zarnas) paraugus piegrieza un ielika audu kasetēs (Bio-Optica, Itālija) apstrādei audu procesorā LEICA ASP200S (Leica, Vācija). Sekojoši tos ieslēdza parafīna blokos (n=28), izmantojot ieguldīšanas iekārtu Tissue Embedding System TES 99 (MEDITE, Vācija). Izmantojot mikrotomu, tika sagatavoti 4 µm biezi griezumi (n=168) un krāsoti pēc Hematoksilīna – Eozīna metodes (H&E) (Carson, 1997), Perjodskaibes-Šiffa metodes (PAS) (Kiernan J. A., 2008) un Alciānzilā pH 2.5 metodes (AB) (Bio-Optica protokols).

Histoloģisko griezumu mikroskopiskā izmeklēšana. Tievās (*jejunum*) un resnās (*colon*) zarnas H&E histoloģiskajos griezumos (n=56) novērtēja vispārīgo morfoloģisko un **histopatoloģisko stāvokli**, izmantojot gaismas mikroskopu (Zeiss, Vācija). Analizēja divus audu griezumus katram paraugam 100-1000× palielinājumā, nosakot iekaisuma smaguma pakāpi (ballēs no 0 līdz 4), iekaisuma izplatību (difūzs, lokāls, multifokāls), iekaisuma šūnu, eritrocītu daudzumu (no 0 līdz 4) un mikroorganismu klātbūtni.

Lai iegūtu tievās (*jejunum*) un resnās (*colon*) zarnas **mikromorfometriskos mēriņumus**, analizējām H&E krāsotos griezumus (n=56), izmantojot gaismas mikroskopu (Leica, DM3000LED, Vācija), kameru (Leica DFC450, Vācija) un histoloģisko attēlu apstrādes un analizēšanas programmu (Leica Application Suite, versija 4.10.0). Ieguvām sekojošus mēriņumus – zarnu bārkstiņu (*villi intestinales*) augstumu (VH), platumu (VW) un kriptu (*cryptae intestinales*) dziļumu (CD), kausveida šūnu (*enterocyti calciformes*, GC) skaitu un blīvumu. Griezumus mikroskopējām 100-400× palielinājumā trīs atkārtojumos, izmērot 10 labi orientētas zarnu bārkstiņu un kriptu struktūras. VH mēriņām no zarnu bārkstiņas virsotnes līdz bārkstiņas pamatnei. VW mēriņām

zarnu bārkstiņas vidusdaļā, bet CD – no kriptas ieliekuma (invaginācijas) zemākā punkta līdz bārkstiņas pamatnei. Skaitījām kopējo GC skaitu tievās un resnās zarnas bārkstiņās un kriptās, un izteicām to kā n/kriptā, n/bārkstiņā un blīvumu – kā GC skaitu attiecībā pret bārkstiņu augstumu vai kriptu dzīlumu ( $\mu\text{m}$ ).

**Neitrālo (PAS+) un skābo mukopolisaharīdu saturošu (AB+) kausveida šūnu (GC) diferencēšanu un skaitīšanu veicām, analizējot pēc PAS un AB metodes krāsotus audu griezumus ( $n=112$ ). PAS+GC iekrāsojās purpura krāsā, bet AB+GC – gaiši zilā krāsā. Katrā paraugā trijos atkārtojumos atlasījām desmit labi orientētās zarnu bārkstiņas un kriptu struktūras. Noteicām PAS+GC un AB+GC skaitu bārkstiņās un kriptās, kā arī izteicām to blīvumu kā PAS+GC un AB+GC skaitu attiecībā pret bārkstiņas augstumu un kriptu dzīlumu ( $\mu\text{m}$ ).**

### 1.3.6. Imūnhistoķīmiskā izmeklēšana

Krāsojām sivēnu zarnu audu griezumus ar imūnhistoķīmijas (IHC) metodēm un noteicām kodola proteīnu Ki67, lai vizualizētu zarnu epiteliju šūnas to dzīves cikla aktīvajās fāzēs, bet CD3 virsmas proteīnu – lai identificētu T limfocītus sivēnu zarnās. Imūnreaktīvo (Ki67, CD3) šūnu iezīmēšanai tika izmantots Dako EnVision®+System HPR reaģēntu komplekts un reakcijas izpildītas saskaņā ar ražotāja protokolu. Nēmot vērā nosakāmos rādītājus – Ki67+ un CD3+ šūnas, reakcijas izpildes laikā attiecīgi tika mainītas primārās – Ki67 kodola proteīna (Dako, clone MIB-1, IR621) un CD3 virsmas antivielas (Dako, A0452). Lai arī abas iepriekšminētās antivielas ir ražotas cilvēka šūnu proteīnu vizualizācijai, taču autoru ziņojumi (Wiarda et al., 2020; Wiyaporn et al., 2013) pierāda šo antivielu spēju iezīmēt attiecīgos šūnu proteīnus cūkām.

IHC reakciju izpildes iekšējai kvalitātes kontrolei tika gatavoti pozitīvās un negatīvās kontroles paraugi, izmantojot cilvēka mandeles histoloģiskos griezumus no Rīgas Austrumu Klīniskās Universitātes Slimnīcas Patoloģijas centra arhīva. Pozitīvajos kontroles paraugos imūnreaktīvās CD3 šūnas galvenokārt lokalizējas mandeles ekstra-folikulārajā zonā un raksturīga CD3+ šūnu membrānu iekrāsošanās brūnā krāsā. Savukārt imūnreaktīvās Ki67 šūnas galvenokārt lokalizējas mandeles germinatīvajos centros, kur to īpatsvars sastādīja 80-90% no šūnu skaita, raksturīga Ki67+ šūnu kodolu iekrāsošanās brūnā krāsā. Negatīvās kontroles paraugi tika pagatavoti no iepriekšminētajiem audiem, bet primārā antiviela (CD3/Ki67) tika aizvietota ar antivielas šķīdinātāju (Antibody Diluent, Dako, S3022). Negatīvās kontroles paraugos netika konstatēta CD3+ un Ki67+ šūnu struktūru iekrāsošanās brūnā krāsā.

IHC griezumu mikroskopiskā analīze. Ar IHC metodi krāsotu sivēnu zarnu audu griezumu analīzi veicām izmantojot  $100\text{-}400\times$  palielinājumu. Proliferējošo epiteliju šūnu (Ki67+) skaitu noteicām desmit labi orientētās tievās un resnās zarnas kriptu struktūrās un izteicām kā pozitīvo šūnu skaitu  $n/100\ \mu\text{m}$ .

Intraepiteliālo T limfocītu (IEL CD3+) skaitu noteicām desmit labi orientētās tievās un resnās zarnas bārkstiņu un kriptu struktūrās un izteicām kā pozitīvo šūnu skaitu n/100 µm. CD3+ šūnu relatīvo biežumu analizējām *jejunum* un *colon lamina propria* (gan zarnu bārkstiņu, gan kriptu daļā), Peijera platēs (interfolikulu, kupola + folikulu zonā) un resnās zarnas submukozā. Katru paraugu analizējām desmit pēc nejaušības principa atlasītos redzes laukos katrai struktūrai. CD3+ šūnām vizualizējām brūnu šūnas membrānu, bet Ki67+ šūnām – brūnā krāsā iekrāsotu kodolu. Relatīvo CD3+ šūnu biežumu noteicām pēc puskvantitatīvās skaitīšanas metodes (Pilmane et al., 1998).

### **1.3.7. Augu ēterisko eļļu (EO) kīmiskā satura noteikšana**

Kīmisko sastāvu mūsu pašu ekstrahētajām un komerciālajām ēteriskajām eļļām (EO, n=6) noteicām, izmantojot gāzu hromatogrāfijas metodi ar hromatogrāfu (Perkin Elmer, Clarus 580), kas aprīkots ar masselektīvo detektoru (Clarus SQ 8 C). Savienojumi izdalīti, izmantojot poli-etylēnglikola stacionārās fāzes Omegawax 250 kapilāro kolonnu (30 m × 0.25 mm, 0.25 µm sorbenta slāniša biezums). Iekārtas vadību nodrošināja „TurboMass Ver6.0.0” programmatūra, bet datu apstrāde realizēta ar „NIST MS 2.2 Library”(FairCom Corp., ASV) datorprogrammu. EO komponenti tika identificēti atbilstoši to izdalīšanās indeksiem (Iwanami et al., 1997; Keita et al., 2000; Njoroge et al., 1996; Tabanca et al., 2006) un salīdzināti ar atsauces spektru datu bāzēs (Wiley/NIST). Visiem EO komponentiem tika eksperimentāli noteikts izdalīšanās indekss vadoties pēc n-alkānu izdalīšanās laiku programmētas temperatūras apstākļos, izmantojot divu funkciju aprēķinu vienādojumu (Mjøs, 2004).

### **1.3.8. Augu ēterisko eļļu (EO) un bagātināto EO antibakteriālās efektivitātes pārbaude**

Lai noteiktu EO antibakteriālo aktivitāti, pārbaudei izmantojām desmit *E. coli*/ESBL producējošos *E. coli*, kas tika izolēti no cūku fekālijām un *E. coli* references celmu ATCC 25922 kontrolei (Bioscience, Apvienotā Karaliste).

EO antibakteriālo aktivitāti noteicām, izmantojot buljona mikro-atšķaidījuma metodi (CLSI, 2018a), nosakot minimālo inhibitoro koncentrāciju (MIC) un minimālo bakterīcīdo koncentrāciju (MBC) kā aprakstīts iepriekš (Mandrika et al., 2021). MIC ir minimālā EO koncentrācija, kura redzami kavē baktēriju augšanu, MBC – minimālā EO koncentrācija, kura nepieciešama, lai panāktu baktēriju bojāeju – sākotnējā inokulāta bakteriālās koncentrācijas

samazinājums par 99.5% un 95%. Inhibēto baktēriju procentuālo daudzumu apreķinājām saskaņā ar iepriekš ziņotu vienādojumu (Cheng et al., 2015).

**MIC noteikšanai** izmantojām  $20\pm2$  h vecu *E. coli* standartkultūru ar blīvumu 0.5 McF. Sekojoši veicām tās atšķaidījumus, lai sasniegstu  $1.5 \cdot 10^6$  kvv mL<sup>-1</sup>. EO atšķaidījām ar DMSO (Dimethyl sulfoxide, Sigma-Aldrich, D2650) līdz koncentrācijai 500  $\mu\text{L}$  mL<sup>-1</sup>. Sekojoši katrā 96 iedobīšu plates iedobē ienesām 100  $\mu\text{L}$  Millera-Hintona buljonu (Muller – Hinton Broth, Oxoid). Pirmajā plates iedobītē ienesām testējamās 100  $\mu\text{L}$  EO pagatavoto šķīdumu un veicām sērijveida atšķaidījumus. Paralēli veicām DMSO un gentamicīna 0.5 mg mL<sup>-1</sup> antibakteriālās efektivitātes kontroli – tiem veicot sērijveida atšķaidījumus tāpat kā EO šķīdumam. Visās testa iedobītēs pievienojām 50  $\mu\text{L}$  baktēriju saturošu inokulātu un vēl 50  $\mu\text{L}$  fizioloģisko šķīdumu (0.9% w/v) (bagātināto EO antimikrobiālās aktivitātes noteikšanas testā fizioloģiskā šķīduma daļa tika aizstāta attiecīgi ar hipertonisku NaCl vai kaprilskābes šķīdumu) kā rezultātā katrā plates iedobītē bija baktēriju suspensija ar koncentrāciju  $5 \cdot 10^5$  kvv mL<sup>-1</sup>. EO koncentrācija iedobēs pēc sērijveida atšķaidīšanas bija no 125  $\mu\text{L}$  līdz 0.000238  $\mu\text{L}$  mL<sup>-1</sup>. Negatīvajai kontrolei plates iedobītē saturēja tikai 200  $\mu\text{L}$  Millera-Hintona buljona, bet pozitīvajai kontrolei – iedobītē saturēja 100  $\mu\text{L}$  Millera – Hintona un 100  $\mu\text{L}$  baktēriju saturošas suspensijas. No pozitīvās kontroles 1  $\mu\text{L}$  inokulējām Millera-Hintona agarā (Muller Hinton agar II, Biolife), lai noteiktu reālo kvv koncentrāciju iedobītē un izmantotu MBC noteikšanai. Mikroplates inkubējām  $36\pm1$  °C,  $20\pm2$  h. Pēc inkubācijas nolasījām MIC, kas bija pēdējā dzidrā iedobe pirms iedobes, kurā nenovēro barotnes sadulķošanos. **Lai noteiktu MBC**, no katras dzidrās iedobes pārsējām 1  $\mu\text{L}$  uz Millera-Hintona agara. Inkubējām  $36\pm1$  °C,  $20\pm2$  h un skaitījām kvv. Viszemākā EO koncentrācija, kas nodrošināja 95% un 99.5% baktēriju nogalināšanu, tika apzīmēta kā MBC 95% un MBC 99.5%. Katras EO antibakteriālo efektivitātes pārbaudi atkārtojām divos atkārtojumos.

Lai noteiktu bagātināto EO (ar 3% NaCl vai 1mM kaprilskābi) **MIC un MBC vērtības**, sākotnēji sagatavojām sekojošus izejas šķīdumus – 12% NaCl-dejonizēta ūdens šķīdums (w/v) un 4 mM kaprilskābes šķīdums (nepieciešamo kaprilskābes daudzumu izšķīdinājām 20% spirta – destilēta ūdens šķīdumā). Ar NaCl un kaprilskābi bagātināto EO antibakteriālo efektivitāti noteicām pēc iepriekš aprakstītās metodikas, bet testa izpildes laikā pirms baktēriju saturoša inokulāta ienešanas katrā no testa iedobēm fizioloģiskā šķīduma daļu (50  $\mu\text{L}$ ) aizvietojām attiecīgi ar 50  $\mu\text{L}$  12% NaCl šķīdumu vai 50  $\mu\text{L}$  4 mM kaprilskābes spirta-ūdens šķīdumu, kā rezultātā katras testa iedobītē saturēja attiecīgi 3% NaCl piedevas vai 1.0 mM kaprilskābes piedevas. Paralēli kontrolējām 3% NaCl ietekmi un 1.0 mM kaprilskābes spirta – ūdens šķīduma ietekmi uz baktēriju augšanas inhibēšanu vai to bakterīcīdo efektu. Sekojoši noteicām bagātināto EO MBC 99.5% un MBC 95% kā aprakstīts iepriekš.

### 1.3.9. Datu statistiskā analīze

Visiem kvantitatīvajiem mērījumiem aprēķinājām tādus rādītājus kā vidējo aritmētisko ( $\bar{x}$ ), standartnovirzi (SD) un (SE).

Lai raksturotu pret dažādām antibiotikām rezistentā *E. coli* izplatību un ESBL producējošā *E. coli* sastopamības atšķirības starp lielajām un mazajām cūkkopības saimniecībām, starp dažāda vecuma cūku grupām, izmantojām  $\chi^2$  testu (*Chi – Square test*) un pāru salīdzināšanu kā *post-hoc* testu. Lai salīdzinātu antibiotiku rezistences izplatību, kā arī ESBL kodējošo gēnu sadalījumu ESBL producējošiem *E. coli* lielo un mazo cūkkopības saimniecību grupās, izmantojām Fišera testu. Noteicām ESBL gēnu ietekmi uz antimikrobiālās rezistences fenotipisko izpausmi, izmantojot izredzes attiecību (*odds ratio*) un 95% ticamības intervālu.

Izmantojām vienfaktoru dispersijas analīzi, lai noteiktu faktora (barības komponenta veids) ietekmi uz pētāmajām pazīmēm – asins bioķīmijas un hematoloģijas rādītājiem, baktēriju populācijas izmaiņām, tievās un resnās zarnas histomorfologiskajām izmaiņām un taukskābju sastāva izmaiņām muskulāudos. Konstatējot faktora būtisku iedarbību, Dankana daudzpakāpju tests tika veikts, lai noteiktu starp kurām faktora gradācijas klasēm pastāv būtiskas atšķirības. Lai izvērtētu CD3+ šūnu relatīvā biežuma (semikvantitatīvs datus) izplatības būtiskuma atšķirības starp pētījuma grupām, veicām neparametrisko Kruskala-Vallisa (*Kruskal-Wallis*) testu, kas paredzēts vairāku neatkarīgu grupu salīdzināšanai pēc vienas pazīmes. Noraidot nulles hipotēzi, kā *post-hoc* testu izmantojām Konovera – Imana (Conover – Iman) vairāku pāru salīdzināšanas testu.

Izmantojām divu faktoru dispersijas analīzi, lai noteiktu faktoru EO izcelstsme (komerciālā/Latvijas) un EO veids (*T. serpyllum*, *T. vulgaris* un *S. montana*) ietekmi uz pētāmo pazīmi – antibakteriālo darbību (MIC/MBC). Tāpat divu faktoru dispersijas analīze tika izmantota, lai noteiktu faktoru (komerciālās EO veids) un bagātinošās piedevas (kaprilskābes, NaCl) ietekmi uz pētāmo pazīmi – antibakteriālo darbību (MIC/MBC). Noraidot nulles hipotēzi, kā *post-hoc* testu izmantojām Bonferroni testu, lai noteiktu būtiskuma līmeni starp grupām. T-testu saistītām paraugkopām izmantojām, lai salīdzinātu iegūto pazīmju (MIC/MBC) vidējās vērtības katram EO veidam, savukārt t-testu nesaistītām paraugkopām – lai salīdzinātu katras komerciālās EO (ar/bez piedevas) MIC vidējās vērtības pret ESBL producējošiem un ESBL ne-producējošiem, kā arī MDR un ne-MDR *E. coli*.

Rezultātus uzskatījām par statistiski nozīmīgiem, ja p vērtība bija mazāka par 0.05, bet tendence uz nozīmīgumu, ja p vērtība bija intervālā no 0.05–0.10. Pētījuma rezultātu datu ievadei un datu vizuālajai atainošanai izmantojām datorprogrammu Microsoft Excel 2016 (16.0.4266.1001). Datu statistisko apstrādi veicām ar R Studio programmu (versija 1.1.463).

## **2. PĒTĪJUMA REZULTĀTI UN DISKUSIJA**

### **2.1. Rezistentā un ESBL producējošā *E. coli* izplatība cūkkopības saimniecībās**

*Escherichia coli* (*E. coli*) ir komensiāla baktērija cilvēku, dzīvnieku, tostarp cūku gremošanas traktā, taču daļa no *E. coli* celmiem ir patogēni un var izraisīt dažādas slimības, tostarp kolibakteriozi, kas īpaši aktuāla zīdēj- un atšķirtiem sivēniem (Gyles & Fairbrother, 2010). Turklat *E. coli* pieder pie *Enterobacteriaceae* dzimtas baktērijām, kam piemīt spēja iegūt un apmainīties ar rezistences gēniem konjugācijas jeb horizontālās gēnu pārneses laikā, padarot *E. coli* par rezistento gēnu rezervuāru (C. Tan et al., 2012). Būtiski, ka rezistentie *E. coli* spēj izplatīties ne tikai populācijā starp dzīvniekiem, bet arī uz cilvēkiem, turklāt rezistentie gēni konjugācijas laikā var tikt pārnesti citām patogēnām baktēriju sugām (EFSA & ECDC, 2020). Tādēļ svarīgi no sabiedrības un dzīvnieku veselības aspekta ir noteikt komensiālā *E. coli* rezistenci cūku populācijā, īpaši pievēršot uzmanību atšķirīga vecuma cūkām, saimniecības lielumam kā antimikrobiālās rezistences ietekmējošajiem faktoriem.

Saskaņā ar cūkkopības saimniecību īpašnieku/veterinārstaru sniegto informāciju vairums saimniecībās cūku ārstēšanā plaši lietoja penicilīnus, plašas darbības penicilīnus, bet cefalosporīnu lietošanu cūku ārstēšanā norādīja divas saimniecības (L1 un L3). No ne-β-laktāmu grupas antibiotikām visbiežāk cūku ārstēšanā izmantoja oksitetraciklīnu, trimetoprima-sulfadiazīnu un fluorohinolonu grupas antibiotikas (2.1. tabula). Taču jāatzīst, ka jautājumi par antibiotiku lietošanas paradumiem cūku ārstēšanā tiek atbildēti izvairīgi un nepilnīgi. Kādā apjomīgā pētījumā Lekaguls ar līdzautoriem konstatēja, ka detalizētas informācijas iegūšanai par antibiotiku lietošanu cūku saimniecībās, ir nepieciešamas citas metodes nevis anketēšana, piemēram, antibiotiku izlietošanas pārskati (Lekagul et al., 2019).

Saskaņā ar SPKC "Vienas veselības" ziņojumu (SPKC, 2019), 2015.-2019. gadā Latvijā produktūvajiem dzīvniekiem pārdotākās antibiotiku grupas bija tetraciklīni (29.4-28.2%), plaša spektra penicilīni (20.1-14.9%), makrolīdi, linkozamīdi (10.6-14.5%), aminoglikozīdi (8.8-15.6%), sulfonamīdi un trimetoprims (5.9-5.3%), fluorohinoloni (2.9-3.1%). Eiropā, saskaņā ar 10. ESVAC ziņojumu (European Medicines Agency, 2021), kur apkopoti dati par 31 Eiropas valsti, pārdotākās antibiotiku klases bija tetraciklīni (30.7%), penicilīni (28.8%), makrolīdi un linkozamīdi (12.1%), sulfonamīdi un trimetoprims (10.1%), aminoglikozīdi (6.2%) un fluorohinoloni (2.5%).

2.1. tabula / Table 2.1.

**Cūkkopības saimniecību raksturojums, profilaktiskie pasākumi un visbiežāk lietotās antibiotikas (AB) cūku  
ārstēšanai / Characteristics of pig farms, prophylaxis and antimicrobial policy**

Ferma, sivēnmāšu skaits / Farm, Total number of sows	Atšķiršanas vecums (dienās) / Time to weaning (days)	Diarejas sastopamība sivēniem, kritiskie periodi / Diarrhea, critical periods	ZnO kā barības piedeva / ZnO as feed additive	Lietotās antibiotikas / Antibiotics used	
				β-laktāmu AB / β-lactams	Ne-β-laktāmu AB / Non-β-lactams
L1, 2100	28	bieži/common	150mg kg <sup>-1</sup>	AMX, CFT	CS, ENO, MAR, OT, SXT <sup>a</sup>
L2, 700	33	bieži/common	150mg kg <sup>-1</sup>	P, AMX	GM, OT, TMP+S,
L3, 1700	28	sporādiski/sporadically	150mg kg <sup>-1</sup> , 2500mg kg <sup>-1</sup> <sup>b</sup>	CFT, CFQ	CS, ENO, GM, OT, TMP+S,
L4, 1000	28	sporādiski/sporadically	150mg kg <sup>-1</sup>	P, AMC	OT TMP+S,
S1, 15	28	bieži/common	-	P, AMX	ENO, OT, TMP+S
S2, 40	28 – 42	reti/rare	-	-	TY
S3, 20	40	reti/rare	-	-	TM

AMX – amoksicilīns/*amoxicillin*, AMC – amoksicilīns+klavulānskābe/*amoxicillin-clavulanic acid*, CFT – ceftiofūrs/*ceftiofur*, CFQ – cefkvinoms/*cefquinome*, CS – kolistīns/*colistin*, ENO – enrofloksacīns/*enrofloxacin*, GM – gentamicīns/*gentamicin*, OT – oksitetraciklīns/*oxytetracycline*, P – penicilīns/*penicillin*, MAR – marbofloksacīns/*marbofloxacin*, TM+S – trimetoprim + sulfadiazīns/*trimethoprim + sulfadiazine*, ZnO – cinka oksīds / *zinc oxide* <sup>a</sup> – antibiotikas tiek mainītas ik pēc trim mēnešiem / *the antibiotic is changed every three months* <sup>b</sup> – īslaicīgi, 2-3 nedēļas pēc atšķiršanas / *short-term, 2-3 weeks after weaning*.

Balstoties uz mūsu pētījuma rezultātiem, cūkkopības saimniecībās komensiālajam *E. coli* ir ļoti augsts rezistences līmenis pret tetraciklīnu 54.63% (n=336); augsts – pret ampicilīnu 32.03% (n=197), trimetoprimu 24.07% (n=148), sulfametoksazola-trimetoprimu 22.44% (n=138), amoksicilīnu-klavulānskābi 22.28% (n=137); vidēji augsts – pret hloramfenikolu 12.68% (n=78); zems – pret fluorokvinaloniem (enrofoksacīnu – 8.78%, ciprofloksacīnu – 3.58%), gentamicīnu (5.69%), cefazolīnu (4.55%) un trešās paaudzes cefalosporīniem (cefotaksīmu) – 1.46%. Netika novērota *E. coli* rezistence pret karbapenēmu grupas antibiotiku – imipenēmu.

Ja salīdzinām izolētā *E. coli* rezistenci cūku populācijā un biežāk lietotās antibiotikas cūkkopības saimniecībās, kā arī biežāk pārdotās antimikrobiālās vielas Latvijā un Eiropā, vērojama sakarība, ka izolētā *E. coli* visaugstākā rezistence vērojama pret antibiotikām, kuras biežāk tiek lietotas cūku ārstēšanā, proti, tetraciklīniem, plašas darbības penicilīniem un trimetoprima kombinācijām ar sulfonamīdiem. Līdzīgi kā mūsu pētījuma rezultātos, arī Eiropas Savienības ikgadējā antimikrobiālās rezistences ziņojumā (EFSA & ECDC, 2020), un vairums pētnieku pasaulei ir uzsveruši no cūkām izolētā *E. coli* augsto rezistenci pret tetraciklīnu, ampicilīnu un trimetoprimu, sulfametoksazolu (Burow et al., 2019; Hayer et al., 2020; Ström et al., 2017).

Valsts uzraudzības programmas attiecībā uz antimikrobiālo rezistenci ir vērstas uz noteiktu vecuma grupu dzīvniekiem, taču dažādām cūku ražošanas un vecuma grupām rezistences izplatība būtiski atšķiras (Burow et al., 2019).

Mūsu pētījumā, no **četru nedēļu veciem sivēniem** izolētiem *E. coli* novērojām augstu rezistenci pret tetraciklīnu (66.4%), trimetoprimu un tā kombināciju ar sulfametoksazolu (attiecīgi 37.3% un 40.0%), ampicilīnu (38.2%), hloramfenikolu (25.5%), gentamicīnu (10.9%), fluorohinoloniem (7.2%) (2.2. tabula). Zīdējsivēnu mikrobiotu lielā mērā ietekmē baktēriju vertikālā pārnešana no sivēnmātes (maksts, piens) un vides (grīdas, dzirdnes nipeļa virsmas); taču laktācijas laikā aizvien lielāku nozīmi sivēnu zarnu mikrobiotai piešķir sivēnmātes fekālā mikrobiota, līdz laktācijas beigās sivēni to imitē (Chen et al., 2018). Sivēnmāšu ārstēšana ar antibiotikām pēcdzemdību periodā būtiski palielina rezistento *E. coli* izplatību sivēniem, turklāt ne tikai pret ārstēšanā lietotajām antibiotikām (Callens et al., 2015).

**Atšķirtiem sivēniem** konstatējām būtisku *E. coli* rezistences samazināšanos pret enrofoksacīnu (0.7%), gentamicīnu (2.7%), hloramfenikolu (2.7%), bet nemainīgi augsta saglabājās pret tetraciklīnu (58.3%), trimetoprimu (21.2%), savukārt rezistencēi pret ampicilīnu (42.53%) un amoksicilīnu-klavulānskābi (32.18%) bija vērojama tendence pieaugt. Trijās no septiņām mūsu pētījumā iekļautajām cūku saimniecībām diarejas sastopamība tika raksturota kā bieža, divās – sporādiska; turklāt biežāk pēcatšķiršanas periodā. Līdzšinējie pētījumi uzsver, ka visbiežāk antibiotikas tiek lietotas sivēniem pēcatšķiršanas periodā (69.5%), kamēr zīdišanas periodā – 22.5% gadījumu.

Pēcatšķiršanas periodā pamatā (82%) tiek izmantota dzīvnieku grupveida ārstēšana (metafilakse), turklāt biežāk minētās aktīvās vielas ir paplašināta spektra penicilīni (31.2%) un polimiksīni (24.7%) (Sarrazin et al., 2019). Parasti cūku ārstēšana *per os* tiek saistīta ar paaugstinātu rezistences attīstības risku (Varga et al., 2009), taču ir autori, kas uzsver, ka ikviens antibiotiku terapija rada risku (Burow et al., 2019).

2.2. tabula / Table 2.2.

**Pret antibiotikām rezistentā *E. coli* izplatība (%) dažāda vecuma cūkām /  
The prevalence of resistant *E. coli* (%) in pigs of different age**

AB	Rezistento <i>E. coli</i> izplatība / The prevalence of resistant <i>E. coli</i> , %					Sivēn-mātes/ Sows, n=77	p vērtība / p value		
	Cūku vecums nedēļās / Age of pigs in weeks, n								
	4, n=110	6, n=151	8, n=105	12, n=87	20, n=85				
AM	38.2 <sup>a</sup>	35.8 <sup>a</sup>	38.1 <sup>a</sup>	42.5 <sup>a</sup>	14.1 <sup>b</sup>	15.6 <sup>b</sup>	<0.001		
CIP	7.3	2.0	4.8	4.6	1.2	1.3	0.104		
CTX	0.9	4.0	1.0	1.2	0.0	0.0	0.128		
CZ	0.1 <sup>b</sup>	6.6 <sup>b</sup>	3.8 <sup>b</sup>	11.5 <sup>a</sup>	2.4 <sup>b</sup>	1.3 <sup>b</sup>	0.004		
IMP	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.000		
GM	10.9 <sup>a</sup>	2.7 <sup>bc</sup>	7.6 <sup>ab</sup>	5.8 <sup>ab</sup>	0.0 <sup>c</sup>	7.8 <sup>ab</sup>	0.010		
AMC	30.0 <sup>ab</sup>	17.2 <sup>ab</sup>	29.5 <sup>ab</sup>	32.2 <sup>a</sup>	16.5 <sup>bc</sup>	6.5 <sup>c</sup>	<0.001		
SXT	40.0 <sup>a</sup>	21.2 <sup>b</sup>	26.7 <sup>ab</sup>	21.8 <sup>b</sup>	1.2 <sup>c</sup>	18.2 <sup>b</sup>	<0.001		
TMP	37.3 <sup>a</sup>	21.2 <sup>a</sup>	30.5 <sup>a</sup>	26.4 <sup>a</sup>	3.5 <sup>b</sup>	22.1 <sup>a</sup>	<0.001		
C	25.5 <sup>a</sup>	2.7 <sup>c</sup>	15.2 <sup>ab</sup>	20.7 <sup>ab</sup>	3.5 <sup>bc</sup>	11.7 <sup>b</sup>	<0.001		
TE	66.4 <sup>a</sup>	58.3 <sup>ab</sup>	58.1 <sup>ab</sup>	65.5 <sup>a</sup>	30.6 <sup>c</sup>	40.2 <sup>bc</sup>	<0.001		
ENO	7.3 <sup>a</sup>	0.7 <sup>b</sup>	3.8 <sup>ab</sup>	1.2 <sup>ab</sup>	0.0 <sup>b</sup>	2.6 <sup>ab</sup>	0.012		

AB – antibiotika/antibiotic, AM – ampicilīns/ampicillin, CIP – ciprofloxacīns/ciprofloxacin, CTX – cefotaksīms/cefotaxime, CZ – cefazolīns/cefazolin, IMP – imipenēms/imipenem, GM – gentamicīns/gentamicin, AMC – amoksicilīns-klavulānskābe / amoxicillin-clavulanic acid, SXT – sulfametoksazols-trimetoprimīs/sulfamethoxazole-trimethoprim, TMP – trimetoprimīs(trimethoprim, C – hloramfenikols/chloramphenicol, TE – tetraciklīns/tetracycline, ENO – enrofloksacīns/enrofloxacin; <sup>a, b, c</sup> – vidējās vērtības vienā rindā ar dažādiem burtiem ir būtiski atšķirīgas ( $p<0.05$ ) / mean values in the same row with different letters are significantly different ( $p<0.05$ ).

**Nobarojamajām cūkām** novērojām būtisku *E. coli* rezistences samazināšanos pret vairumu no testētajām antibiotikām – tetraciklīnu (30.6%), ampicilīnu (14.1%), trimetoprimu un tā kombināciju ar sulfametoksazolu (attiecīgi 3.5% un 1.2%), bet rezistence pret gentamicīnu un enrofloksacīnu netika konstatēta. Rezistentā *E. coli* izplatība samazinās cūku nobarošanas

periodā (Akwar et al., 2008; Burow et al., 2019), jo būtiski samazinās ārstēšanas biežums (8%) (Sarrazin et al., 2019), turklāt ir jāizvairās no antibiotiku atliekvielām cūkgalā (Akwar et al., 2008).

**Salīdzinot rezistentā *E. coli* izplatību lielajās un mazajās cūkkopības saimniecībās**, rezultāti atklāj, ka tā ir augstāka ( $p < 0.01$ ) lielo saimniecību grupā pret astoņām no 12 antibiotikām (ampicilīnu, amoksicilīnu-klavulānskābi, sulfametoksazolu-trimetoprimu, trimetoprimu, gentamicīnu, tetraciklīnu, hloramfenikolu un enrofloksacīnu), savukārt, ne pret vienu no antibiotikām nenovēroja būtiski augstāku rezistenci mazo saimniecību grupā. *E. coli* rezistence pret ciprofloksacīnu, cefotaksīmu un cefazolīnu būtiski neatšķirās starp lielo un mazo saimniecību grupām un tika vērtēta kā loti zema (2.3. tabula).

2.3. tabula / Table 2.3.

**Pret antibiotikām (AB) rezistentā *E. coli* izplatība (%) lielajās un mazajās cūkkopības saimniecībās / The prevalence of resistant *E. coli* (%) on the large and small pig farms**

AB	Rezistento <i>E. coli</i> izplatība / The prevalence of resistant <i>E. coli</i> , %									p vērtība <i>/ p value</i>	
	Lielās saimniecības / Large farms, n=465					Mazās saimniecības / Small farms, n=150					
	L1, n= 115	L2, n= 127	L3, n= 121	L4, n= 102	Ā	S1, n= 40	S2, n= 69	S3, n= 41	Ā		
AM	35.7	29.9	26.5	72.6	<b>39.8</b>	7.5	13.0	0.0	<b>8.0</b>	<0.001	
CIP	5.2	0.8	7.4	3.9	<b>4.3</b>	2.5	1.5	0.0	<b>1.3</b>	0.213	
CTX	0.9	5.5	0.8	0.0	<b>1.9</b>	0.0	0.0	0.0	<b>0.0</b>	0.488	
CZ	5.2	4.7	1.7	11.8	<b>5.6</b>	0.0	2.9	0.0	<b>1.3</b>	0.114	
IMP	0.0	0.0	0.0	0.0	<b>0.0</b>	0.0	0.0	0.0	<b>0.0</b>	1.000	
GM	22.6	3.9	0.0	3.9	<b>7.5</b>	0.0	0.0	0.0	<b>0.0</b>	0.006	
AMC	24.4	7.9	14.1	71.6	<b>27.5</b>	7.5	8.7	0.0	<b>6.0</b>	<0.001	
SXT	50.4	22.8	25.6	17.7	<b>29.3</b>	2.5	1.5	0.0	<b>1.3</b>	<0.001	
TMP	50.2	24.4	32.2	15.7	<b>31.4</b>	2.5	1.5	0.0	<b>1.3</b>	<0.001	
C	31.3	4.7	9.10	20.6	<b>15.9</b>	0.0	4.4	2.4	<b>2.7</b>	<0.001	
TE	66.1	70.9	51.2	82.4	<b>67.1</b>	15.0	8.7	29.3	<b>16.0</b>	0.003	
ENO	28.7	1.6	9.9	5.9	<b>11.4</b>	2.5	0.0	0.0	<b>0.7</b>	0.004	

AB – antibiotika/antibiotic, AM – ampicilīns/ampicillin, CIP – ciprofloksacīns/ciprofloxacin, CTX – cefotaksīms/cefotaxime, CZ – cefazolīns/cefazolin, IMP – imipenēms/imipenem, GM – gentamicīns/gentamicin, AMC – amoksicilīns-klavulānskābe/amoxicillin-clavulanic acid, SXT – sulfametoksazols-trimetoprimi/sulfamethoxazole-trimethoprim, TMP – trimetoprimi(trimethoprim, C – hloramfenikols/chloramphenicol, TE – tetraciklīns/tetracycline, ENO – enrofloksacīns/enrofloxacin.

Mūsu rezultāti saskan ar citiem ziņojumiem (Burow & Käsbohrer, 2017; Ström et al., 2017), ka cūku ganāmpulka lielumam ir pozitīva asociācija ar augstāku rezistentā *E. coli* izplatību, taču citi autori uzsver multifaktoru ietekmi uz rezistenci veicinošiem apstākļiem (Dewulf et al., 2007; Dohmen et al., 2017).

**Multirezisto (MDR) baktēriju** rašanās rada būtisku apdraudējumu ne tikai dzīvnieku veselībai, bet visai sabiedrībai (Aarestrup, 2005; Tanwar et al., 2014). Ja salīdzinam **MDR *E. coli* izplatību lielajās un mazajās cūkkopības saimniecībās**, tad būtiski augstāku tā izplatību konstatējām lielajās (42.4%) nekā mazajās (2%) saimniecībās (2.4. tabula), turklāt 27.92% (n=55) no izolētajiem MDR *E. coli* lielajās saimniecībās novērojām rezistenci pret piecām un vairāk antibiotiku klasēm. Ja salīdzinam **MDR *E. coli* izplatību starp dažāda vecuma cūku grupām**, augsts MDR *E. coli* izplatības līmenis (36.42-47.27%) tika novērots 4 līdz 12 nedēļu veciem sivēniem un jauncūkām, viszemākais – nobarojamajām cūkām (11.76%), bet sivēnmātēm – 14.29% (2.5. tabula). Jāuzsver, ka 63.64% no sivēnmātēm izolētie MDR *E. coli* uzrādīja rezistenci pret piecām un vairāk antibiotiku klasēm, savukārt nobarojamajām cūkām tik plaši MDR *E. coli* fenotipi netika konstatēti. Četru, astoņu un 12 nedēļu veciem sivēniem to īpatsvars sasniedza 30.77 līdz 35.90%.

2.4. tabula / Table 2.4.

**Multirezisto *E. coli* izplatība (%, (n)) lielajās un mazajās cūkkopības saimniecībās / The prevalence of multidrug-resistant *E. coli* (%,(n)) on the large and small pig farms**

Antimikrobiālo līdzekļu kategoriju skaits / The number of antimicrobial categories (Magiorakos et al., 2012)	Saimniecības/Farm	
	Lielās/Large, (n=465)	Mazās/Small, (n=150)
0	23.01 (107)	71.33 (107)
1	24.73 (115)	22.00 (33)
2	9.46 (44)	4.67 (7)
3	22.37 (104)	2.00 (3)
4	8.60 (40)	0.00 (0)
5	7.31 (34)	0.00 (0)
6	3.44 (16)	0.00 (0)
7	0.86 (4)	0.00 (0)
8	0.22 (1)	0.00 (0)
Kopā/Total MDR <i>E. coli</i> ( $\geq 3$ )	<b>42.80 (199)</b>	<b>2.00(3)</b>

MDR *E. coli* – multirezistente / multidrug-resistant *E. coli*.

Kā viens no iemesliem augstākai MDR *E. coli* izplatībai lielāka izmēra ganāmpulkos ir daudzveidīgāku antimikrobiālo līdzekļu izmantošana cūku ārstēšanai (Ström et al., 2017), kas tika konstatēts arī mūsu pētījumā, turklāt

MDR baktēriju, t.sk., *E. coli* atlasi sekmē antimikrobiālo līdzekļu lietošana kombinācijās (Varga et al., 2009). Interesanti, ka pētījumā Taizemē, augstāka (95.7%) MDR *E. coli* izplatība tika novērota vidēja lieluma (500–5000 cūkas) nekā lielajās (>5000 cūkas) saimniecībās – 87.7%, kas tika skaidrots ar efektīvāku biodrošības vadību un regulārākām veterinārārsta vizītēm saimniecībā (Dawangpa et al., 2022). Salīdzinot MDR *E. coli* izplatību starp dažādām cūku vecuma grupām, redzamas rezistentā *E. coli* izplatības vispārējās tendences – MDR *E. coli* izplatība samazinās cūku ražošanas cikla laikā, t.i., cūku nobarošanas periodā, turklāt tiem raksturīgi šaurāki MDR *E. coli* fenotipi. Bet bieža un dažādu antimikrobiālo līdzekļu lietošana *per os* atšķiršanas periodā rezultējas ar augstāku MDR *E. coli* izplatību sivēniem (Varga et al., 2009).

2.5. tabula / Table 2.5.

**Multirezistento *E. coli* izplatība (%, (n)) dažāda vecuma cūkām / The prevalence of multidrug-resistant *E. coli* (%) in pigs of different age**

Antimikrobiālo līdzekļu kategoriju skaits / The number of antimicrobial categories (Magiorakos et al., 2012)	Cūku vecums, nedēļas / Age of pigs, in weeks, n					Sivēnmātes/ Sows, n=77
	4, n= <b>110</b>	6, n= <b>151</b>	8, n= <b>105</b>	12, n= <b>87</b>	20, n= <b>85</b>	
0	20.9	34.4	28.6	21.8	61.2	49.4
1	24.6	22.5	23.8	27.6	21.2	26.0
2	7.3	6.6	10.5	10.3	5.9	10.4
3	21.8	27.2	18.1	16.1	7.1	3.9
4	10.9	6.6	5.7	8.1	4.7	1.3
5	8.2	2.7	7.6	9.2	0.0	6.5
6	4.6	0.0	4.8	5.7	0.0	1.3
7	1.8	0.0	0.0	1.2	0.0	1.3
8	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0
Kopā/Total MDR <i>E. coli</i>	<b>47.3</b>	<b>36.4</b>	<b>37.1</b>	<b>40.2</b>	<b>11.8</b>	<b>14.3</b>

MDR *E. coli* – multirezistentie / multidrug-resistant *E. coli*.

Kopumā pētījumā iekļautajās septiņās cūkkopības saimniecībās atklājām 89 dažādus rezistentā *E. coli* fenotipus. Visbiežāk konstatētais fenotips TE (19%) bija rezistents tikai pret vienu antibiotiku, t.i., tetraciklīnu, bet tai pašā laikā – 37% no visiem fenotipi saturēja rezistenci pret fluorohinoloniem. Visbiežāk novērotie MDR *E. coli* fenotipi bija AM-AMC-TE (6.5%, n=40) un AM-SXT-TMP-TE (4.9%, n=30). Viens no izolētajiem *E. coli* fenotipi AM-CZ-GM-AMC-SXT-TMP-C-TE-ENO uzrādīja rezistenci pat pret 9 no 12 antibiotikām. Gan mūsu rezultāti, gan citu autoru pētījumi atklāj ļoti lielu rezistentā *E. coli* fenotipu dažādību cūku populācijā (Akwar et al., 2008; Jahanbakhsh et al., 2016), taču vairumā gadījumu tiem dominē rezistence pret tādām antibiotikām kā  $\beta$ -laktāmiem-trimetoprimu-sulfonamīdiem-tetraciklīnu.

**ESBL producējošā *E. coli* sastopamība cūku populācijā.** Antibiotiku, īpaši  $\beta$ -laktāmu intensīvu un nepareiza lietošana humānajā un veterinārmedicīnā ir sekmējusi ESBL producējošo baktēriju selekciju un izplatību. Pasaules Veselības organizācija ir norādījusi, ka pret trešās paaudzes cefalosporīniem rezistentie *Enterobacteriaceae*, t.sk., ESBL producējošie *E. coli* ir viena no pasaules nopietnākajām un kritiskākajām 21. gadsimta problēmām (WHO, 2017). Saskaņā ar mūsu rezultātiem, izmantojot selektīvi diferenciālo metodi un izmeklējot 615 cūku fekāliju paraugus no septiņām cūkkopības saimniecībām, ESBL producējošā *E. coli* klātbūtni konstatējām četrās (L1, L2, L3 un S1) cūku audzēšanas saimniecībās, kopumā 144 paraugos (23.4%).

Starp lielajām cūkkopības saimniecībām, visaugstāko ESBL producējošā *E. coli* sastopamību novērojām saimniecībā L1 (64.3%), kamēr starp mazajām – saimniecībā S1 (47.5%). Lai arī ESBL producējošie *E. coli* sastopami biežāk ( $p=0.029$ ) lielajās (26.9%) nekā mazajās cūkkopības saimniecībās (12.7%), tomēr jāuzsver, ka ESBL producējošo *E. coli* sastopamības biezums būtiski atšķiras savstarpēji starp fermām gan lielo, gan mazo saimniecību grupās (2.6. tabula).

2.6. tabula / Table 2.6.

**ESBL producējošu *E. coli* sastopamība (%,(n)) lielajās un mazajās cūkkopības saimniecībās / Occurrence of ESBL-producing *E. coli* on the large and small pig farms, (%)**

Saimniecības lielums / Farm size	Sastopamība/Occurrence, % (n)
Lielās/Large (n=465)	L1 (n=115) 64.3 <sup>a</sup> (74)
	L2 (n=127) 29.9 <sup>b</sup> (38)
	L3 (n=121) 10.7 <sup>c</sup> (13)
	L4 (n=102) 0
Mazās/Small (n=150)	S1 (n=40) 47.5 <sup>a</sup> (19)
	S3 (n=41) 0
	S2 (n=69) 0

a, b, c. – vidējās vērtības vienā kolonnā ar dažādiem burtiem ir būtiski atšķirīgas / mean values in the same column with different letters are significantly different ( $p<0.05$ ).

Izvērtējot ESBL producējošo *E. coli* izplatību dažāda vecuma un fizioloģiskā stāvokļa cūkām, ievērojami augstāku tā izplatību novērojām četru un sešu nedēļu veciem sivēniem (28.3% un 35.1%) un sivēnmātēm (41.6%), savukārt zemāku – 20 nedēļu vecām nobarojamajām cūkām (8.2%) (2.7. tabula).

Mūsu rezultāti atklāj, ka saimniecības lielums varētu būt viens no riska faktoriem augstākai ESBL producējošo *E. coli* sastopamībai cūku fekālijās, taču pret šo apgalvojumu ir jābūt piesardzīgiem, jo mūsu pētījumā abas saimniecības ar visaugstāko ESBL producējošā *E. coli* sastopamību bija novērojamas gan lielo (L1), gan mazo saimniecību grupā (S1). Līdz šim autori uzsvēruši neskaitāmus

faktorus (piem. trūkumi biodrošības pasākumos, pārmērīga antibiotiku, īpaši cefalosporīnu un fluorohinolonu lietošana), kas veicina ESBL producējoša *E. coli* sastopamību cūku saimniecībās (Dohmen et al., 2017; Gay et al., 2018). Arī mēs novērojām cēlopsakarību starp palielinātu diarejas aktualitāti sivēniem, plašāku antibiotiku lietošanu un sekojoši biežāku ESBL producējošo *E. coli* sastopamību cūkkopības saimniecībās. Visās cūkkopības saimniecībās (L1, L2, L3 un S1), kur konstatējām ESBL producējošu *E. coli* klātbūtni, diarejas sastopamība sivēniem tika vērtēta kā “bieža” (L1, L2 un S1) vai “sporādiska” (L3), turklāt ārstēšanā izmantoja amoksicilīnu (L1, L2, S1), fluorohinolonus (L1, L3, S1) un/vai cefalosporīnu (L1, L3). Amoksicilīns cūkām ir pieejams *per os* lietošanai, taču tam ir zema uzsūkšanās un biopieejamība (Reyns et al., 2009), tādējādi radot lielu selektīvu spiedienu uz zarnu mikrobiotu, kas sekmē rezistences selekciju (Burch & Sperling, 2018). Domājams, amoksicilīna *per os* lietošana varētu būt viens no būtiskākajiem faktoriem ESBL producējošo *E. coli* izplatībai sivēniem atšķiršanas periodā. Fluorohinolonu loma ESBL producējošo *E. coli* izplatības veicināšanā ir ziņota jau iepriekš (Basu & Mukherjee, 2018) un varēja sekmēt ESBL producējošo *E. coli* sastopamību L1, L3 un S1 saimniecībās. Turpretī saimniecībās S2 un S3 sivēniem diareju novēroja reti, ārstēšanā tika izvēlēti ne- $\beta$ -laktāma grupas antibakteriālie līdzekļi, kas izskaidro ESBL producējošo *E. coli* neesamību šo saimniecību cūku fekālijās.

#### 2.7. tabula / Table 2.7.

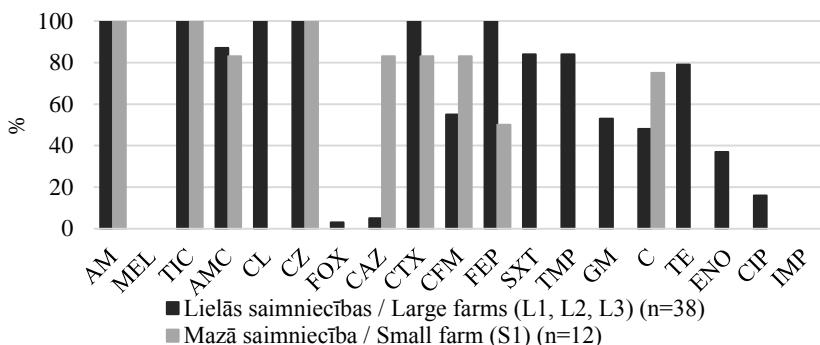
#### **ESBL producējošu *E. coli* sastopamība (%), (n) dažāda vecuma cūkām/ Occurrence of ESBL-producing *E. coli* in pigs of different age**

Cūku vecums / Age of the pigs	Sastopamība/Occurrence %, (n)
Cūku vecums nedēļās <i>Age of pigs in weeks</i> (n=538)	28.2 <sup>a</sup> (31)
4 (n=110)	35.1 <sup>a</sup> (53)
6 (n=151)	10.5 <sup>b</sup> (11)
8 (n=105)	11.5 <sup>b</sup> (10)
12 (n=87)	8.2 <sup>b</sup> (7)
20 (n=85)	
Sivēnmātes/Sows (n=77)	41.6 <sup>a</sup> (32)

<sup>a, b</sup> – vidējās vērtības vienā kolonnā ar dažādiem burtiem ir būtiski atšķirīgas / mean values in the same column with different letters are significantly different (p<0.05).

Visiem ESBL producējošajiem *E. coli* novērojām rezistenci pret ampicilīnu, tikarcilīnu un cefazolīnu. No lielajām cūkkopības saimniecībām izolētajiem ESBL producējošiem *E. coli* novērojām rezistenci (100%) pret cefaleksīnu, cefotaksīmu, cefepimu, turklāt bieži konstatējām rezistenci pret amoksicilīnu-klavulānskābi (87%), trimetoprimu (84%), sulfametaksazolu-trimetoprimu (84%), tetraciklīnu (79%) un gentamicīnu (53%), savkārt mazajās – tie bieži bija rezistenti pret ceftazidīmu (83%), cefotaksīmu (83%), cefiksīmu

(83%), hloramfenikolu (75%) un cefepīmu (50%). ESBL producējošiem *E. coli* nenovērojām rezistenci pret mecilīnu un imipenēmu (2.1. attēls).

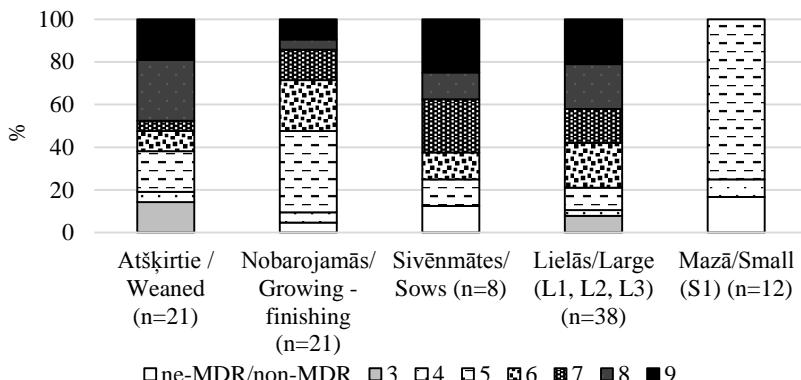


2.1. att. / Fig. 2.1. Antibiotiku rezistences izplatība (%) izolētajiem ESBL producējošajiem *E. coli* lielo un mazo cūku saimniecību grupās / Prevalence of resistance (%) in isolated ESBL-producing *E. coli* from pigs on the large and small farms

AM – ampicilīns/ampicillin, MEL – mecilīns/mecillinam, TIC – tikarcilīns/ticarcillin, AMC – amoksicilīns-klavulānskābe / amoxicillin-clavulanic acid, CL – cefaleksīns/cefalexin, CZ – cefazolīns/cefazolin, FOX – cefoksītīns/cefoxitin, CAZ – ceftazidīms/ceftazidime, CTX – cefotaksīms/cefotaxime, CFM – cefiksīms/cefixime, FEP – cefepīms/cefepime, SXT – sulfametoksazols-trimetoprimi / sulfamethoxazole-trimethoprim, TMP – trimetoprimi/trimethoprim, GM – gentamicīns/gentamicin, C – hloramfenikols/chloramphenicol, TE – tetraciklīns/tetracycline, ENO – enroflokssacīns/enrofloxacin, CIP – ciprofloksacīns/ciprofloxacin, IMP – imipenēms/imipenem.

Mūsu pētījumā 96% (n=48) no izolētajiem ESBL producējošiem *E. coli* tika klasificēti kā MDR, turklāt tiem, kas izolēti no atšķirtajiem sivēniem (47.6%) un sivēnmātēm (37.5%), bieži novēroja rezistenci pret astoņām un vairāk antibiotiku klasēm, bet šāda līmeņa rezistentie ESBL producējošie *E. coli* būtiski retāk tika novēroti nobarojamām cūkām (14.2%) (2.2. attēls). Plašāki MDR ESBL producējošie *E. coli* fenotipi ir ziņoti zīdējsivēniem un atšķirtajiem sivēniem salīdzinot ar nobarojamajām cūkām arī citos pētījumos (Akwar et al., 2008; De Lucia et al., 2021). Vispārējie rezistences veicinošie faktori, kā pārmērīga/nepareiza antimikrobiālo līdzekļu lietošana sivēniem metafilakses formā ne tikai ārstēšanai, bet arī profilaksei, īpaši tādēļ, ka jauniem dzīvniekiem ir paaugstināts zarnu infekciju risks un biežāk tie tiek pakļauti dažādām stresa situācijām (sivēnu atšķiršanai, metienu apvienošanai, barības un vides maiņai) (Akwar et al., 2008) varētu veicināt arī MDR ESBL producējošo *E. coli* izplatību. Savukārt sivēnmātes, lai arī biežāk antibakteriālos līdzekļus saņem individuāli (parenterāli), kas varētu būt pozitīvs faktors rezistences izplatības ierobežošanai (Jensen et al., 2012). Taču tā kā sivēnmāšu ārstēšanai mūža periodā tiek izvēlēti

dažādāka veida (aktīvās sastāvdaļas) pretmikrobu līdzekļi (Lekagul et al., 2020), tas varēja veicināt ekstensīvāku MDR ESBL producējošu *E. coli* fenotipu veidošanos, kā arī augstāku to izplatību.



**2.2. att. / Fig. 2.2. Multirezistences līmeni sadalījums (%) ESBL producējošiem *E. coli*, izolētiem no dažāda vecuma cūkām un saimniecībām / Proportion of different levels of MRD in ESBL-producing *E. coli* isolates from pigs of different age stages and farms of different sizes**

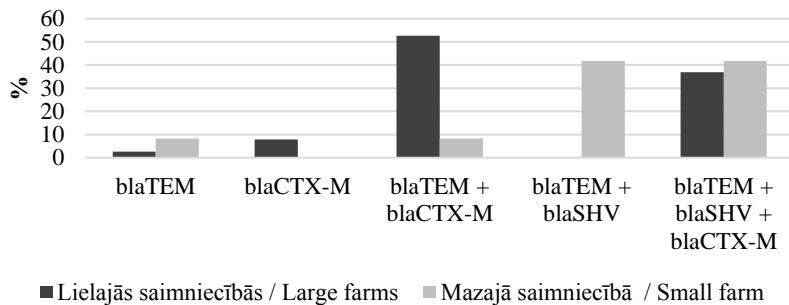
Visi ESBL producējošie *E. coli* no lielajām cūkkopības saimniecībām tika klasificēti kā MDR, turklāt vairums no tiem raksturojās ar plašiem MDR fenotipi, t.i., 79% bija rezistenti pret sešām un vairāk antibiotiku klasēm. Pretstatā mazajā cūku audzēšanas saimniecībā nevienam no izolētajiem ESBL producējošajiem *E. coli* nenovēroja rezisenci pret sešām vai vairāk antibiotiku klasēm, turklāt 16,7% netika klasificēti kā MDR. (2.2. attēls).

Mūsu iegūtie rezultāti apstiprina citu autoru novērojumus, ka MDR ESBL producējošie *E. coli* biežāk tiek izolēti no lielajām nekā mazajām cūkkopības saimniecībām (Ström et al., 2017). Mūsu pētījumā augstāku MDR ESBL izplatību lielajās cūkkopības saimniecībās varēja veicināt ne tikai metafilakse (Varga et al., 2009), bet arī cinka oksīda kā barības piedevas izmantošana. Visās mūsu apsekotajās lielajās cūku saimniecībās (L1, L2, L3 un L4) izmantoja cinka oksīdu kā barības piedevu sivēniem pēcatšķiršanas periodā, tādēļ tas varēja būt vērā ķemams faktors ekstensīvāku MDR fenotipu izplatībai lielajās cūkkopības saimniecībās. Ir vairāki ziņojumi, ka augstas devas cinka oksīda iekļaušana cūku barības devā var sekmēt antimikrobiālās rezistences un MDR fenotipu selekciju cūku zarnās (Ciesinski et al., 2018; Hölzel et al., 2012).

**ESBL producējošo *E. coli* un to kodējošie ESBL gēni.** Visos fenotipiski apstiprinātajos ESBL producējošajos *E. coli* konstatējām vismaz vienu ESBL kodējošo gēnu, kas apstiprina, ka mūsu izolētie *E. coli* spēj ražot ESBL enzīmus.

Visbiežāk konstatētais ESBL kodējošais gēns bija *bla<sub>TEM</sub>* (94%; n=47), tad sekoja *bla<sub>CTX-M</sub>* (86%, n=43) un *bla<sub>SHV</sub>* (48%, n=24). Vairumā gadījumu (90%; n=45) ESBL kodējošos gēnus novērojām divu vai vairāku gēnu kombinācijās. Visbiežāk novērotā ESBL gēnu kombinācija bija *bla<sub>TEM</sub>* un *bla<sub>CTX-M</sub>* (42%; n=21), kam sekoja visu trīs gēnu (*bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>* un *bla<sub>CTX-M</sub>*) līdzāspastāvēšana (36%; n=19), bet retāk *bla<sub>TEM</sub>* un *bla<sub>SHV</sub>* (10%; n=5) gēnu kombinācija. Līdzīgi kā mēs novērojām savā pētījumā, arī vairāki Eiropas zinātnieki ir konstatējuši augstu *bla<sub>CTX-M</sub>* un *bla<sub>TEM</sub>* izplatību cūku populācijā, un visbiežāk šie ESBL kodējošie gēni ir konstatēti esot kombinācijā (Barilli et al., 2019; Biasino et al., 2018; Von Salviati et al., 2014).

Mazajā saimniecībā (S1) ESBL kodējošā gēna *bla<sub>SHV</sub>* klātbūtni, kopā ar ciem blā kodējošajiem gēniem, konstatējām ievērojami biežāk nekā lielajās saimniecībās (83.3% pret 36.8%, p=0.007), savukārt *bla<sub>CTX-M</sub>* kodējošā gēna klātbūtni ievērojami biežāk novērojām lielajās saimniecībās (97.4% pret 50.0%, p<0.001). Lielajās saimniecībās visizplatītākās ESBL kodējošo gēnu kombinācijas bija *bla<sub>TEM</sub>* un *bla<sub>CTX-M</sub>* (52.6%, n=20), bet mazajās saimniecībās – *bla<sub>TEM</sub>* un *bla<sub>SHV</sub>* (41.7%, n=5) (2.3. attēls). Mūsuprāt, viens no galveniem iemesliem augstākai gēna *bla<sub>CTX-M</sub>* izplatībai lielajās saimniecībās varētu būt profilaktiska cinka oksīda kā barības piedevas izēdināšana cūkām. Kādā nesenā pētījumā, izmantojot fekāliju mikrobioma modeli *in vitro*, tika atklāts, ka cinka oksīda pievienošana fekāliju suspensijai palielināja plazmīdu kodēto gēnu *bla<sub>CTX-M</sub>* saturošu *E. coli* īpatsvaru salīdzinot ar pārējo mikrobiotu; turklāt cinks sekmēja rezistences gēnu ekspresiju *E. coli* celmos (Peng et al., 2020). Domājams, arī mūsu pētījumā iekļautajās lielajās saimniecībās cinks varēja sekmēt plazmīdās kodētu ESBL producējošo *E. coli* celmu izplatību, kā arī inducēt gēna *bla<sub>CTX-M</sub>* ekspresiju.



2.3. att. / Fig. 2.3. **ESBL kodējošo gēnu sadalījums (%) izolētajiem *E. coli* lielajās un mazajā cūku saimniecībās / Distribution of ESBL gene(s) on the large and small farms**

Tā kā paplašinātā spektra SHV un TEM  $\beta$ -laktamāzes raksturojas ar augstāku ceftazidīma hidrolītisko aktivitāti (Liakopoulos et al., 2016), bet CTX-M – ar spēcīgāku cefotaksīma hidrolītisko aktivitāti (Bonnet, 2004), tas izskaidro sakarību, ka lielajās cūku saimniecībās biežāk konstatētais gēns *bla*<sub>CTX-M</sub> noteica ESBL producējošo *E. coli* fenotipisko rezistenci pret cefotaksīmu, bet mazajā saimniecībā dominējošais gēns *bla*<sub>SHV</sub> – rezistenci pret cefotaksīmu.

Analizējot ESBL producējošo *E. coli* fenotipisko rezistenci un kodējošos gēnus, novērojām pozitīvu asociāciju starp **gēnu *bla*<sub>SHV</sub>** klātbūtni un fenotipiski izpausto rezistenci pret amoksiklīnu-klavulānskābi, ceftazidīmu un cefiksīmu, bet **gēnam *bla*<sub>CTX-M</sub>** – pret cefaleksīnu un vairākām ne- $\beta$ -laktāma antibiotikām – enrofloksacīnu, tetraciklīnu, gentamicīnu, trimetoprimu un sulfametoksazolu-trimetoprimu (2.8. tabula).

2.8. tabula / Table 2.8.

**Statistiski nozīmīgas asociācijas starp ESBL kodējošiem gēniem un fenotipiski konstatēto antibiotiku rezistenci ESBL producējošiem *E. coli* izolātiem / Statistically significant associations between ESBL gene and antimicrobial resistance in ESBL-producing *E. coli* isolates**

<i>ESBL</i> gēns / <i>ESBL</i> gene	Demonstrētā rezistence/ Demonstrated resistance	OR	95% CI	p vērtība/ p value
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	AMC	6.79	1.39 – 66.10	0.0083
	CL	0.12	0.03 – 0.41	0.0001
	CAZ	8.38	2.47 – 37.17	0.0001
	CFM	4.36	1.70 – 12.00	0.0009
	FEP	0.15	0.01 – 0.79	0.0124
	SXT	0.30	0.12 – 0.77	0.0067
	TMP	0.30	0.12 – 0.77	0.0067
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	CL	34.86	6.63 – 357.80	0.0001
	CTX	6.77	0.45 – 101.68	0.0931
	CAZ	0.08	0.01 – 0.33	0.0001
	SXT	15.03	3.02 – 148.12	0.0001
	TMP	15.03	3.02 – 148.12	0.0001
	GM	inf	2.90 – inf	0.0003
	TE	12.11	2.45 – 118.82	0.0003
	ENO	inf	1.46 – inf	0.0093

AB – antibiotika/antibiotic, AMC – amoksicilīns-klavulānskābe / amoxicillin-clavulanic acid, CL – cefaleksīns/cefalexin, CAZ – ceftazidīms/ceftazidime, CFM – cefiksīms/cefixime, FEP – cefepīms/cefepime, SXT – sulfametoksazols-trimetoprimi / sulfamethoxazole-trimethoprim, TMP – trimetoprimi/trimethoprim, CTX – cefotaksīms/cefotaxime, GM – gentamicīns/gentamicin, TE – tetraciklīns/tetracycline, ENO – enrofloksacīns/enrofloxacin, OR – izredzes attiecība / odds ratio, 95% CI – 95% ticamības intervāls / confidence interval, inf – bezgalība/infinity.

Dažiem SHV (arī TEM)  $\beta$ -laktamāžu mutantiem ir viena aminoskābes maiņa Amblera numerācijā, tādēļ tie ļem pārsvaru pār pirmās paaudzes  $\beta$ -laktamāzes inhibitoriem (klavulānskābi) (Bush & Bradford, 2019; Cantón et al., 2008), kas varētu izskaidrot novēroto pozitīvo asociāciju *blasHV* ar fenotipisko rezistenci pret amoksiciklinu-klavulānskābi. Savukārt ESBL kodējošā gēna *blasHV* un tā fenotipiski izpaustā rezistence pret ceftazidīmu tiek skaidrota ar Glu240Lys aizvietošanu, kas nodrošina spēcīgāku hidrolītisko aktivitāti pret ceftazidīmu nekā cefotaksīmu (Liakopoulos et al., 2016). Vairums plaša spektra  $\beta$ -laktamāzes ir īpaši aktīvas pret pirmās paaudzes cefalosporīniem (Paterson & Bonomo, 2005), tāpēc nepārsteidz gēna *blaCTX-M* pozitīvā asociācija ar novēroto rezistenci pret cefaleksīnu. Savukārt gēna *blaCTX-M* pozitīvā asociācija ar novēroto rezistenci pret vairākām ne- $\beta$ -laktāma antibiotikām varētu norādīt uz noteiktu MDR ESBL producējošo *E. coli* klonu izplatību. Turkāt ESBL gēni visbiežāk lokalizēti plazmīdās un kopā ar citiem tur inkorporētiem rezistences gēniem, spēj nodrošināt līdzrezistenci ar aminoglikozidiem, fluorohiinoloniem, trimetoprimu-sulfametoksazolu, tetraciklinu un citām antibiotikām (Balkhed et al., 2013; Ozgumus et al., 2008). Tādēļ arī gēns *blaCTX* ir saistīts ar ekstensīviem MDR baktēriju celmiem (Zeynudin et al., 2018).

## 2.2. Probiotiku, griķu kliju un augu komponentu izbarošanas ietekme uz sivēnu vispārīgo un zarnu veselību

Cūkkopības industrijā ir nozīmīgi uzlabot dzīvnieku ēdināšanas stratēģiju, izmantojot arī dažādas dabīgas augu izcelsmes barības piedevas, kas uzlabotu dzīvnieku veselības stāvokli, stimulētu augšanu un samazinātu antibiotiku lietošanu. Lai izvērtētu **vispārējo sivēnu veselības stāvokli** pirms un pēc pētījuma, ieguvām un izvērtējām hematoloģiskos un atsevišķus seruma bioķīmiskos rādītājus. Gan uzsākot pētījumu (14.diena), kā arī pētījuma noslēgumā (56. diena) visi hematoloģiskie un seruma bioķīmiskie rādītāji ieklāvās sivēnu vecumam atbilstošajās normu robežās.

Viens no svarīgākajiem sivēnu veselības priekšnosacījumiem kritiskajā periodā ir **zarnu labvēlīgās mikrobiotas attīstība**. Komensālā mikrobiota, kolonizējot zarnas un piesaistoties zarnu glotādas slānim, novērš patogēno baktēriju kolonizāciju (O'Hara & Shanahan, 2006), turklāt tā piedalās gremošanas procesos, sekmē zarnu glotādas nobriešanu un imūnsistēmas attīstību, piedaloties tās indukcijā un funkcionēšanā (Kamada et al., 2013; O'Hara & Shanahan, 2006).

Pētījuma sākumā, sivēniem 14. dzīves dienā, nenovērojām būtiskas *Enterobacteriaceae* dzimtas baktēriju un *E. coli* skaits atšķirības **fekalijās** starp pētījumā ietvertajām grupām. Sivēnu 35. dzīves dienā, *Enterobacteriaceae* dzimtas baktēriju skaits bija zemāks ( $p<0.05$ ) P grupā, salīdzinot ar C grupu.

Sivēnu 56. dzīves dienā, H grupas sivēniem novērojām būtiski zemāku *Enterobacteriaceae* un *E. coli* skaitu salīdzinot ar C grupu, bet PB grupā *Enterobacteriaceae* dzimtas baktēriju ( $p<0.05$ ) un *E. coli* skaits bija zemāks ( $p>0.05$ ), salīdzinot ar P grupu (2.9. tabula).

Probiotiku pozitīvais efekts uz fekāliju mikrobiotu bija vērojams ātrāk, jau pēc trīs pētījuma nedēļām, t.i., nedēļu pēc sivēnu atšķiršanas. *In vitro* pētījumos pierādīts, ka probiotikas samazina gremošanas trakta pH, tādējādi samazinot patogēno baktēriju augšanu (Gibson, 1999). Barības komponentu (H un PB) labvēlīgo efektu uz fekāliju mikrobiotu konstatējām pētījuma noslēgumā (sivēnu 56. dzīves dienā), samazinot *E. coli* un *Enterobacteriaceae* dzimtas baktēriju skaitu fekālijās. Barības komponentu iedarbības laikā atšķirības varētu skaidrot ar to, ka pēc atšķiršanas sivēni iziet tā saukto akūto un adaptīvo atšķiršanas fāzi. Akūtās fāzes efekts ir samazināta barības uzņemšana – var paiet pat septiņas dienas, līdz atšķirtie sivēni iemācās ēst sauso barību un uzņem nepieciešamo sausnas apjomu (Pluske et al., 1997). Nemot vērā šo faktu, mūsuprāt, mūsu pētījumā iekļautie sivēni neuzņēma pietiekami lielā apjomā ar augu izcelsmes barības sastāvdaļām papildināto barību, lai novērotu to labvēlīgo ietekmi uz fekālo mikrobiotu jau sivēnu 35. dzīves dienā. Savukārt probiotiku, kas tika pievienotas sivēniem pie dzeramā ūdens, iedarbība bija novērojama jau sivēnu atšķiršanas akūtajā fāzē.

2.9. tabula / Table 2.9.

**Barības komponentu ietekme uz *Enterobacteriaceae* dzimtas baktēriju un *E. coli* skaitu fekālijās 14., 35. un 56. sivēnu dzīves dienā,  $\bar{x}\pm SE$  / Effect of feed components on the number of *Enterobacteriaceae* and *E. coli* in faecal on the 14<sup>th</sup>, 35<sup>th</sup> and 56<sup>th</sup> day of piglet life,  $\bar{x}\pm SE$**

Mikrobiotas rādītājs / Parameter of microbiota ( $\log_{10}$ KVV g <sup>-1</sup> )	Grupa/Group			
	C	P	PB	H
<b>fekālijās/faecal 14.d:</b>				
<i>Enterobacteriaceae</i>	3.48±0.30	3.69±0.30	3.15±0.89	3.88±0.47
<i>E. coli</i>	3.21±0.44	3.16±0.43	2.86±0.69	3.56±0.54
<b>fekālijās/faecal 35.d:</b>				
<i>Enterobacteriaceae</i>	3.37±0.47 <sup>a</sup>	1.73±0.38 <sup>b</sup>	2.78±0.43 <sup>a,b</sup>	2.95±0.47 <sup>a,b</sup>
<i>E. coli</i>	2.91±0.29	1.66 ± 0.38	2.05 ± 0.35	2.92 ± 0.44
<b>fekālijās/faecal 56.d:</b>				
<i>Enterobacteriaceae</i>	5.19±0.70 <sup>a,b</sup>	5.41±0.23 <sup>a</sup>	3.93±0.52 <sup>b,c</sup>	3.18±0.37 <sup>c</sup>
<i>E. coli</i>	4.94±0.60 <sup>a</sup>	5.02±0.22 <sup>a</sup>	3.85±0.49 <sup>a,b</sup>	3.16±0.33 <sup>b</sup>

d – dzīves diena / days of piglet life, <sup>a, b, c</sup> – vidējās vērtības vienā rindā ar dažādiem burtiem ir būtiski atšķirīgas / mean values in the same row with different letters are significantly different ( $p<0.05$ ).

Vērtējot gremošanas satura mikrobiotas izmaiņas, atkarībā no dažādu barības komponentu iekļaušanas sivēnu barības devā, kontatējām, ka iekļaujot probiotikas, būtiski palielinājās *Lactobacillus* spp. skaits tievās zarnas ( $p<0.05$ ) un resnās zarnas saturā, salīdzinot ar H un C grupām (2.10. tabula). Augu piedevai bija tendence ( $p=0.064$ ) samazināt *Enterobacteriaceae* dzimtas baktēriju skaitu resno zarnu saturā salīdzinot ar C grupu, tāpat H grupas tievo un resno zarnu saturā novērojām viszemāko *E. coli* skaitu, taču samazinājums nebija statistiski nozīmīgs.

2.10. tabula / Table 2.10.

**Barības komponentu ietekme uz *Enterobacteriaceae*, *E. coli* un *Lactobacillus* spp. skaitu *jejunum* un *colon* gremošanas saturā,  $\bar{x}\pm SE$  / The effect of feed components on the number of *Enterobacteriaceae*, *E. coli* and *Lactobacillus* spp. in the digestive content of *jejunum* and *colon*,  $\bar{x}\pm SE$**

Lokalizācija, mikrobiota / Site, <i>microbiota</i> ( $\log_{10}$ kvv g <sup>-1</sup> )	Grupa/Group				p vērtība/ <i>p value</i>
	C	P	PB	H	
<i>jejunum</i>					
<i>Enterobacteriaceae</i>	5.29±2.69	3.92±0.56	3.04±0.85	2.99±0.67	0.470
<i>Escherichia coli</i>	4.74±2.21	3.54±0.46	3.96±0.83	2.99±0.67	0.594
<i>Lactobacillus</i> spp.	6.27±0.82 <sup>b</sup>	7.75±0.24 <sup>a</sup>	6.62±0.14 <sup>ab</sup>	5.98±0.51 <sup>b</sup>	0.035
<i>colon</i>					
<i>Enterobacteriaceae</i>	5.80±0.80 <sup>x</sup>	5.57±0.29 <sup>xy</sup>	4.00±1.04 <sup>xy</sup>	3.55±0.28 <sup>y</sup>	0.094
<i>Escherichia coli</i>	4.86±0.61	5.21±0.26	3.88±0.99	3.51±0.29	0.214
<i>Lactobacillus</i> spp.	6.48±0.27 <sup>y</sup>	7.99±0.03 <sup>x</sup>	7.12±0.42 <sup>xy</sup>	7.12±0.38 <sup>xy</sup>	0.084

<sup>a, b</sup> – vidējās vērtības vienā rindā ar dažādiem burtiem būtiski atšķiras / mean values in the same row with different letters are significantly different ( $p<0.05$ ); <sup>x, y</sup> – vidējās vērtības rindā ar dažādiem burtiem norāda uz tendenci atšķirties starp grupām pie  $0.05 < p \leq 0.10$  / Mean values within a row with different letters indicate a tendency for difference between groups at  $0.05 < p \leq 0.10$ .

Probiotiku spēju palielināt *Lactobacillus* spp. skaitu zarnās ir dokumentēta arī citu autoru pētījumos (Liao & Nyachoti, 2017). Interesanti, ka probiotikām un griķu klijām nebija tik būtiska loma *Lactobacillus* spp. skaita palielināšanā, salīdzinot ar P grupu. Lai arī griķu klijām ir dokumentēta prebiotikām līdzīga aktivitāte (Coman et al., 2013; Préstamo et al., 2003), taču no otras pusēs, griķu klijās koncentrējas vairāki fenoli (Kalinová et al., 2019), kuriem ir pierādīta antibakteriāla aktivitāte (Radovanović et al., 2013; Wang et al., 2013). Tādējādi, griķu klijās esošo fenolu antibakteriālā aktivitāte, domājams, bija vērsta ne tikai uz *Enterobacteriaceae* dzimtas baktēriju samazināšanu gremošanas saturā, bet arī ietekmēja caur ūdeni uzņemto probiotiku darbības efektivitāti. Mūsu izvēlētā augu kombinācija (*U. dioica*,

*P. major* un *H. perforatum*) samazināja *Enterobacteriaceae*, taču būtiski neietekmēja *Lactobacillus* spp. skaitu gremošanas saturā. Kā zināms, augi satur daudz aktīvas sastāvdaļas, kurām piemīt antibakteriālā darbība, kuru dēļ tos uzskata par vienu no daudzsološākajām antibiotiku alternatīvām arī cūku audzēšanā (Omonijo et al., 2018). Taču tai pat laikā neraugoties, ka *Lactobacillus* spp., kas lokalizējas gremošanas traktā, pieder pie Gram pozitīvajām baktērijām un nereti tās ir jutīgākas pret vairums augos esošajām antibiotikeriālajām vielām, salīdzinot ar Gram negatīvajām baktērijām (Burt, 2004), *Lactobacillus* spp. esot kā komensālā mikrobiota veido biomembrānas pie zarnu glotu slāņa, kas izskaidro to, ka saimniekorganismā rezidējošā mikrobiota ir nesalīdzināmi rezistentāka (Donaldson et al., 2016; Omonijo et al., 2018). Mūsuprāt, tas izskaidro pētījumā izmantotās augu kombinācijas spēju sekmīgi modulēt zarnu mikrobiotu, samazinot *Enterobacteriaceae* dzimtas baktēriju skaitu, bet tai pašā laikā būtiski neietekmējot rezidējošo *Lactobacillus* spp. skaitu.

**Izolēto *E. coli* antimikrobiālā rezistence.** Izmeklējot fekāliju paraugus no 14 un 56 dienu veciem sivēniem, ESBL producējošo *E. coli* klātbūtne netika konstatēta, taču, lai raksturotu barības komponentu ietekmi uz rezistentā *E. coli* izplatību, analizējām 80 *E. coli* izolātus. No 14 dienu veciem sivēniem, 66.7% izolēto *E. coli* bija rezistenti pret vismaz vienu antibiotiku klasi, savukārt no 56 dienu veciem sivēniem – 50%. No tā redzams, ka ierobežojot antibiotiku lietošanu sivēniem, rezistences izplatībai ir tendence samazināties. Taču, neraugoties uz to, rezistences izplatība kopumā tika vērtēta kā augsta – pirms pētījuma izolētajiem *E. coli* novērojām biežāku rezistenci pret ampicilīnu (42%) un trimetoprimu (33%), savukārt pētījuma noslēgumā biežāk rezistence tika novērota pret tetraciklīnu P grupā (50%), PB (50%) un H (44%) un pret trimetoprimu – P (50%) un PB (44%) grupās. Rezistence pret hloramfenikolu (38%) un cefotaksīmu (8%) tika novērota tikai kontroles grupā. Sivēniem zarnu mikrobiotas attīstībā būtiska loma ir apkārtējās vides un sīvēnmātes mikrobiotas ietekmei (Langlois et al., 1986). Pētnieki ir novērojuši, ka augstā rezistence izolētajām baktērijām no jaunu dzīvnieku gremošanas trakta ne vienmēr ir saistīta ar antibiotiku izmantošanu, bet gan saistīta ar ģenētiskās rezistences elementu plašo izplatību zarnu mikrobiotas vidū, turklāt, pārejot uz bez-antibiotiku cūku audzēšanu, var samazināt rezistento izolātu izplatības līmeni, taču, visticamāk, pilnīgi eliminēt pret antibiotikām rezistentos gēnus fekāliju mikrobiotā neizdosies (Mathew, 2001). Turklāt ņemot vērā, ka kontroles grupas sivēni saņēma pēcatšķiršanas periodā cinka piedevu, izskaidro augsto MDR *E. coli* izplatību gan kontroles grupā, gan arī pārējās pētnieciskajās grupās. Smago metālu loma multirezistento baktēriju selekcijā sivēnu gremošanas traktā un vidē ir plaši aprakstīta arī zinātniskajā literatūrā (Bednorz et al., 2013; Ciesinski et al., 2018). Mūsuprāt, cinka oksīds ir sekmējis MDR baktēriju augsto izplatību saimniecības vidē, kas ietekmējis arī mūsu pētījuma rezultātus. Taču neskatoties uz to, pētījuma noslēgumā, salīdzinot no pētnieciskajām grupām

izolēto rezistento *E. coli* fenotipisko dažādību, visvairāk variācijas tika novērotas C grupā (7 dažādi fenotipi, rezistence kopumā pret 8 antibiotikām(AB)), kam sekoja P grupa (6 dažādi fenotipi, rezistence kopumā pret 6 AB) un viszemākā – PB un H grupās (4 dažādi fenotipi, rezistence kopumā pret 5 AB) (2.11. tabula). Ir autori, kas novērojuši probiotiku antagonisku ietekmi uz antibiotiku rezistento gēnu pārnešanu, taču šis iedarbības mehānisms joprojām ir neskaidrs (Moubareck et al., 2007). Redzam, ka arī augu piedeva samazina rezistento *E. coli* fenotipisko dažādību, taču plašāki pētījumi nepieciešami darbības mehānismu noskaidrošanai.

2.11. tabula / *Table 2.11.*

**Izolēto rezistento *E. coli* fenotipiskā dažādība (n) fekālijās 56 dienu veciem sivēniem / Phenotypic diversity of isolated resistant *E. coli* (n) in faeces in 56-day-old piglets**

Grupa/Group, n=32							
C	n	P	n	PB	n	H	n
TE-SXT-TMP-C	1	AM-TE-SXT-TMP	3	AM-TE-SXT-TMP	3	AM-CZ-TE-SXT-TMP	3
AM-TE-SXT-TMP-C	1	TE-SXT-TMP	3	AM-CZ-TE-SXT-TMP	3	AM-TE-SXT-TMP	2
AM-TE-AMC-SXT-TMP-C	1	AM-TE-AMC-SXT-TMP	1	TE-TMP	1	TE-TMP	1
TE-TMP-C	1	AM-CZ-TE-SXT-TMP	1	TE	1	TE	1
TE-C	1	TE-SXT-TMP	1				
AM-AMC	1	TE-TMP	1				
AM-CTX-CZ	1						

AM – ampicilīns/*ampicillin*, CTX – cefotaksīms/*cefotaxime*, CZ – cefazolīns/*cefazolin*, AMC – amoksicilīns-klavulānskābe / *amoxicillin-clavulanic acid*, SXT – sulfametoksazols-trimetoprim / *sulfamethoxazole-trimethoprim*, TMP – trimetoprim / *trimethoprim*, C – hloramfenikols/*chloramphenicol*, TE – tetraciklīns/*tetracycline*.

Zarnu epitēlijs un imūnās šūnas kopā ar gļotu slāni nodrošina pirmo barjeru pret zarnu mikrobiotu, patogēniem un ārejiem antigēniem. Atšķiršana no sivēnmātes, sivēniem izraisa stresu, turklāt, vides, barības un sociālās hierarhijas maiņa padara to par kritisko periodu cūku dzīvē; tas izraisa kuņģa-zarnu trakta disfunkciju, glotādas barjeras noārdīšanos un rezultējas ar zarnu iekaisumu un diarejas attīstību (Moeser et al., 2007).

**Histopatoloģiskās izmeklēšanas laikā** visu pētniecisko grupu, 56 dienu vecu sivēnu tievo (*jejunum*) un resno (*colon*) zarnu histoloģiskajos griezumos novērojām vieglu līdz mērenu hronisku, difūzu enterokolītu ar vieglu līdz mērenu eozinofīlo leikocītu, limfocītu un plazmocītu infiltrāciju. Vērtējot

iekaisumu smaguma pakāpes, nekonstatējām būtiskas atšķirības starp pētījuma grupām, ne tievajā ( $p=0.11$ ), ne resnajā ( $p=0.12$ ) zarnā. Kā minēts iepriekš, atšķiršanas perioda izraisīts stress, izmaiņas sivēnu uzturā un vidē, var rezultēties ar ievērojamām funkcionālām un morfoloģiskām izmaiņām sivēniem kungāzarnu traktā, ko mēdz saukt par “ar atšķiršanu saistītu zarnu iekaisumu” (Moeser et al., 2007).

Par būtiskiem zarnu veselības radītājiem tiek uzskatīti tādi **histomorfoloģiskie mērījumi**, kā, piemēram, bārkstiņu augstums (VH), kriptu dzīlums (CD) un VH:CD attiecība (Han et al., 2013). Bagātinot sivēnu pamatbarību ar probiotikām un augu izcelsmes dzīvnieku barības sastāvdaļām, būtiski palielinājās zarnu bārkstiņu augstums H grupā (+35%,  $p<0.05$ ), P grupā (+17%,  $p<0.05$ ) un PB grupā (+12%,  $p<0.05$ ). Novērtējot VH:CD attiecību, būtiski augstāka tā tika konstatēta H, P un PB grupām. Resnajā zarnā, grupām P, PB un H konstatējām dzīlākas kriptas ( $p<0.05$ ), salīdzinot ar C grupu (2.12. tabula).

2.12. tabula / Table 2.12.

**Barības komponentu ietekme uz tievās (*jejunum*) un resnās (*colon*) zarnas bārkstiņu un kriptu morfomikrometriskajiem rādītājiem,  $\bar{x}\pm SE$  / The effect of feed components on the morphomicrometric indicators of villi and crypts of the jejunum and colon intestines,  $\bar{x}\pm SE$**

Rādītājs/ Indi- cators	Grupa/Group				P vērtība/ p value
	C	P	PB	H	
<i>jejunum</i>					
VH, $\mu\text{m}$	357.4 $\pm$ 23.43 <sup>c</sup>	416.9 $\pm$ 9.81 <sup>b</sup>	400.8 $\pm$ 8.87 <sup>b</sup>	482.9 $\pm$ 14.96 <sup>a</sup>	<0.0001
VW, $\mu\text{m}$	146.8 $\pm$ 6.60 <sup>b</sup>	176.8 $\pm$ 6.56 <sup>a</sup>	168.6 $\pm$ 5.50 <sup>a</sup>	168.3 $\pm$ 5.67 <sup>a</sup>	0.0310
CD, $\mu\text{m}$	327.2 $\pm$ 21.48	306.0 $\pm$ 6.95	299.0 $\pm$ 7.94	290.5 $\pm$ 9.61	0.1625
VH:CD	1.1 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>	1.4 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	1.4 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	1.7 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	<0.0001
<i>colon</i>					
CD, $\mu\text{m}$	461.3 $\pm$ 7.01 <sup>c</sup>	533.9 $\pm$ 10.86 <sup>a</sup>	525.9 $\pm$ 12.82 <sup>ab</sup>	498.6 $\pm$ 5.70 <sup>b</sup>	0.0002

VH – bārkstiņu augstums / *villus height*, VW – bārkstiņas platums / *villus width*, CD – kriptas dzīlums / *crypt depth*, VH:CD – zarnu bārkstiņu augstuma (VH) un kriptu dzīluma (CD) attiecība / *ratio of intestinal villi height (VH) to crypt depth (CD)*, SE – standartķūda / *standard error of measurements* <sup>a, b</sup> – vērtības vienā rindā ar dažādiem burtiem būtiski atšķiras / *mean values in the same row with different letters are significantly different ( $p<0.05$ )*.

Augu labvēlīgā ietekme uz zarnu histomorfoloģiskajiem rādītājiem galvenokārt saistīta ar to spēju samazināt baktēriju radīto slodzi zarnās (Zeng et al., 2015). Savukārt probiotikas, nonākot zarnās, veic adhēziju pie gļotu slāņa un enterocītiem, kolonizē noteiktas nišas un izraisa tā saukto “kolonizācijas rezistenci” un aizsargā zarnu bārkstiņas pret patogēniem. Samazināta toksicitāte

un labāka barības vielu uzsūkšanās veicina bārkstiņu augšanu un atjaunošanos (Donaldson et al., 2016; Song et al., 2014). Griķu klijās un augos esošie polisaharīdi uzrāda prebiotikām līdzīgas īpašības (Kamada et al., 2013; Yahfoufi et al., 2018). Pienskābajām baktērijām tos fermentējot, veidojas gaistošās taukskābes (SCFA – acetāts, propionāts, butirāts), kas ir svarīgs enerģijas avots kolonocītu augšanā (Hooper et al., 2002), tādējādi probiotikas un augu izcelsmes barības sastāvdaļas varēja sekmēt kriptu dzīlumu resnajā zarnā, turklāt butirāts ir aktīvs iekaisuma inhibitoris, kas stimulē gлотādas atjaunošanos (Cornick et al., 2015).

Zarnās starp cilindrisko apmaloto epiteliju atrodas izkaisītās **kausveida šūnas (GC)**, kas sekretē glikoproteīnus, kas veido gļotu slāni un pārklāj epitēlijā ūnas. Zemāku ( $p<0.05$ ) GC blīvumu novērojām H grupas tievās zarnas bārkstiņās, turpretī probiotikas palielināja GC skaitu resnās zarnas kriptās (2.13. tabula).

2.13. tabula / Table 2.13.

**Barības komponentu ietekme uz kausveida šūnu skaitu un blīvumu sivēnu zarnās / The effect of feed components on the total number and density of goblet cells in the intestine of piglets,  $\bar{x} \pm SE$**

Kausveida šūnu skaits un blīvums, lokalizācija/ Number and density of goblet cells	Grupa/Group				p vertība/ p value
	C	P	PB	H	
<b>bārkstiņas/villi (jejunum)</b>					
GC n/bārkstiņā/villus	9.05± 0.809	10.88± 0.714	9.98± 0.481	9.55± 0.491	0.2330
GC/ augstuma vienībās / unit height (μm)*	0.03± 0.004 <sup>a</sup>	0.03± 0.002 <sup>a</sup>	0.03± 0.001 <sup>a</sup>	0.02± 0.001 <sup>b</sup>	0.0042
<b>kriptas/crypts (jejunum)</b>					
GC n/kriptā/crypt	21.55± 1.550	23.43± 1.138	22.08± 0.966	20.75± 0.699	0.2761
GC/ dzīluma vienībās / unit depth (μm)*	0.07± 0.007	0.08± 0.004	0.08± 0.004	0.08± 0.003	0.8101
<b>kriptas/crypts (colon)</b>					
GC n/kriptā/crypt	34.90± 1.610 <sup>b</sup>	38.38± 1.118 <sup>a</sup>	35.30± 1.222 <sup>ab</sup>	34.35± 0.660 <sup>b</sup>	0.0394
GC/ dzīluma vienībās / unit depth (μm)*	0.08± 0.004	0.07± 0.002	0.07± 0.002	0.07± 0.003	0.2751

GC – kausveida šūnas / goblet cells, n – skaits/number, \*kausveida šūnu skaits attiecībā uz bārkstiņu augstumu vai kriptu dzīlumu / number of goblet cells per unit of villus height or crypt depth <sup>a,b</sup> – vidējās vērtības vienā rindā ar dažādiem burtiem ir būtiski atšķirīgas / mean values in the same row with different letters are significantly different ( $p<0.05$ ), SE – standartķīlūda / standard error of measurements.

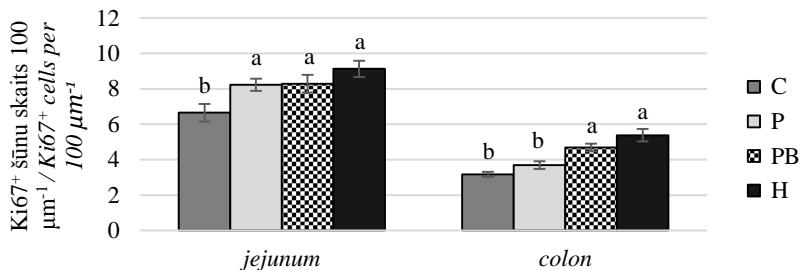
Kausveida šūnu (GC) **ražotie glikoproteīni tiek iedalīti neitrālajos (PAS+)** un **skābajos (AB+)** apakštipos. Gan AB+, gan PAS+ mucīni palielina glotu slāņa viskozitāti epitēlijā aizsardzībai, taču AB+ mucīni specifiski aizsargā pret baktēriju translokāciju (Cao & Wang, 2009). Salīdzinot ar C grupas sivēniem, probiotikas palielināja AB+GC skaitu **tievās** zarnas bārkstīnās ( $p<0.05$ ), tendenciozi – arī **tievo** un **resno** zarnu kriptās, bet augu piedeva samazināja ( $p<0.05$ ) AB+GC blīvumu **tievās** zarnas bārkstīnās. C grupas sivēniem novērojām samazinātu ( $p<0.05$ ) PAS+GC skaitu **resnās** zarnas kriptās.

Par probiotiku spēju palielināt GC proliferāciju un diferenciāciju ir ziņojuši autori jau iepriekš (Desantis et al., 2019; El Aidy et al., 2013). Probiotikas, kolonizējot glotu slāni un atbrīvojot dažādus mucīnu fermentācijas galaproductus, bioaktīvos faktorus, aktivizē dažādas signālu kaskādes un sekrēcijas elementus, tā iedarbojoties tieši uz GC (Meslin et al., 1999; Schutte et al., 2014). Taču probiotikas spēj regulēt mucīna gēna ekspresiju netieši – caur saimniekorganisma imūnās atbildes reakcijām – uz tām iedarbojoties ar baktēriju struktūras elementiem (lipopolisaharīdiem (LPS), flagellīnu A, lioteicoīnskābēm (LTA) un vairākiem metabolītiem (SCFA, adenozīna trifosfātu) (Dharmani et al., 2009). Savukārt mūsu pielietotā augu piedeva, pateicoties tās antimikrobiālajām īpašībām, spēja samazināt mikrobiotas radīto slodzi gremošanas traktā; sekojoši tas varēja samazināt GC blīvumu *jejenum* bārkstīnās.

Pamatojoties uz mūsu pētījuma **imūnhistoķīmisko izmeklējumu rezultātiem**, pētījumā iekļautās probiotikas un augu izcelsmes dzīvnieku barības sastāvdaļas palielināja **epitēlija šūnās (Ki67+)** **proliferāciju** *jejenum* kriptās, bet probiotikas+griķu klijas un augu piedeva – palielināja proliferāciju gan *jejenum*, gan *colon* kriptās (2.4. attēls). Zinātnieki ir konstatējuši vairākus mehānismus kā probiotikas spēj veicināt epitēlija šūnu proliferāciju: pirmkārt, atsevišķi probiotiku celmi samazina ar integrīnu saistītās kināzes gēna ekspresiju enterocītos, tādēļ samazinās citoskeleta  $\beta$ -aktīna līmenis bazālajā membrānā un tas sekojoši destabilizē enterocītu mijiedarbību ar šo bazālo membrānu un palielina šūnu migrācijas ātrumu gar kriptu-bārkstiņu asi; otrkārt, probiotikas palielina šūnu proliferāciju kriptās (Preidis et al., 2012), mijiedarbojoties un regulējot zarnu cilmes šūnas (Preidis et al., 2012; Walker et al., 2009); treškārt, laktātam ir kritiski svarīga loma zarnu cilmes šūnu attīstībā (Lee et al., 2018).

Augu izcelsmes barības sastāvdaļu iekļaušana (PB un H grupās) ievērojami palielināja epitēlija šūnu proliferāciju resnajā zarnā. Griķu klijas ir šķiedrvielu avots (Taylor & Emmambux, 2008), bet augi satur daudz glikozīdu un oglīhidrātus (Feng et al., 2018). Būtiski, ka augi un griķu klijas ir svarīga izejviela SCFA ražošanai (Ushida & Hoshi, 2002; Zhao et al., 2019). Resnajā zarnā absorbētās SCFA ir kā “degviela” glotādas epitēlija šūnām (Cook & Sellin, 1998), tādējādi papildus šķiedrvielu iekļaušana cūku barības devā varēja palielināt SCFA ražošanu resnajā zarnā un sekmēt kolonocītu proliferāciju.

Nozīmīga loma saimniekorganisma aizsardzībā pret patogēniem ir gлотādas imūnsistēmai, ko realizē “ar zarnām saistītie limfoīdie audi” (GALT) un tie sevī ietver organizētos audus (Peijera plates) un izkaisītās šūnas (gлотādas pamatkārtā (*lamina propria*) un starp epitēlijā šūnām (intraepiteliālie limfocīti – IEL) (Mowat & Viney, 1997). Zarnu trakta homeostāzi nodrošina vājas reakcijas stāvoklis pret rezidējošo mikrobiotu un vienlaicīgi aktīva gatavība pret patogēniem (Maeda et al., 2001). Zarnu epitēlija, dendrītiskās un M šūnas tieši uztver gлотādas mikrobiotas, tās metabolītu antigēnus un inducē svečveidīgo (*toll-like*) receptoru veidošanos, lai saistītu T un B limfocītus un sekmētu imūnās atbildes reakcijas (Gutzeit et al., 2014). Īpaši uzmanību mēs pievērsām T limfocītu izplatībai, jo tiem ir būtiska nozīme zarnu homeostāzes nodrošināšanā un imūnās atbildes aktivizēšanā pret patogēniem (Van Wijk & Cheroutre, 2010).



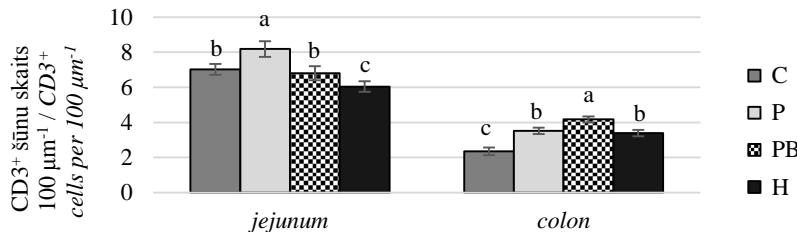
2.4. att. / Fig. 2.4. Barības komponentu ietekme uz Ki67+ epitēlija šūnu blīvumu ( $\bar{x}\pm\text{SE}$ ) sivēnu zarnu kriptās / Effect of feed components on the density ( $\bar{x}\pm\text{SE}$ ) of Ki67+ epithelial cells in the crypts of piglets intestines (a, b) atšķirīgi burti nozīmē būtiskas atšķirības starp pētījuma grupām / different letters mean significant differences between the study groups,  $p<0.05$ .

Sivēniem tievajā zarnā **intraepiteliālo CD3+ šūnu** (IEL) blīvums bija lielāks ( $p<0.05$ ) P grupā, taču H grupā tas būtiski samazinājās ( $p<0.05$ ). Resnajā zarnā lielāks IEL blīvums tika novērots visās pētījuma grupās, kur barības pamatdevai tika pievienotas probiotikas vai augu izcelsmes dzīvnieku barības sastāvdalas (2.5. attēls).

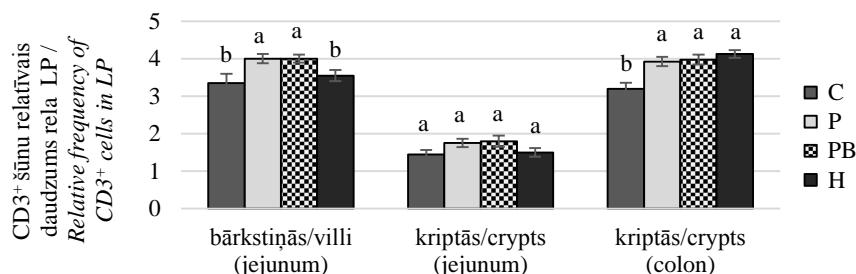
**Novērtējot CD3+ šūnu** relatīvo daudzumu zarnu **gлотādas lamina propria daļā**, konstatējām, ka tievās zarnas bārkstiņu daļā tas bija augstāks ( $p<0.05$ ) P un PB grupu sivēniem, taču resnās zarnas kriptu daļā tas būtiski augstāks bija P, PB un H grupu sivēniem (2.6. attēls).

Vērtējot CD3+ šūnu relatīvo daudzumu **zarnu limfoīdo audu sakopojumos** un **resnās zarnas submukozas daļā**, konstatējām, ka probiotikas un augu piedeva palielināja ( $p<0.05$ ) CD3+ šūnu relatīvo daudzumu Peijera plašu interfolikulārajā un folikulārajā+kupola zonā (2.7. attēls), taču nenovērojām

statistiski nozīmīgas atšķirības starp pētījuma grupām, vērtējot pēc CD3+ šūnu sadalījuma resnās zarnas submukozā.



2.5. att. / Fig. 2.5. Barības komponentu ietekme uz intraepiteliālo CD3+ šūnu blīvumu ( $\bar{x} \pm \text{SE}$ ) sivēnu zarnās / Effect of feed components on the density ( $\bar{x} \pm \text{SE}$ ) of intraepithelial CD3+ cells in the intestines of piglets (a, b, c) atšķirīgi burti nozīmē būtiskas atšķirības starp pētījuma grupām / different letters mean significant differences between the study groups,  $p < 0.05$ .

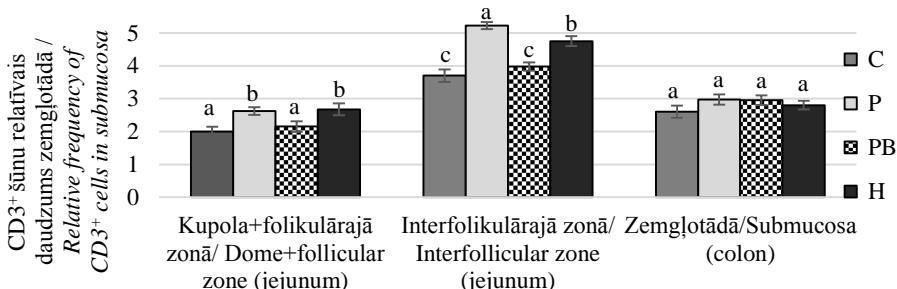


2.6. att. / Fig. 2.6. Barības komponentu ietekme uz CD3+ šūnu relatīvo daudzumu ( $\bar{x} \pm \text{SE}$ ) sivēnu zarnu glotādas lamina propria (LP) daļā / Effect of feed components on the relative frequency ( $\bar{x} \pm \text{SE}$ ) of CD3+ cells in the lamina propria (LP) of piglets' intestines

(a, b) atšķirīgi burti nozīmē būtiskas atšķirības starp pētījuma grupām / different letters mean significant differences between the study groups,  $p < 0.05$ .

Mūsu rezultāti atklāj, ka probiotiku izēdināšana sivēniem palielina IEL blīvumu, T limfocītu izplatību lamina propria (LP) un Peijera platēs (PP). Saimniekorganisma imūnsistēmas attīstībā visbūtiskākā loma ir zarnu mikrobiotai, ko pierāda pētījumi sterilo dzīvnieku modeļos (*germ-free*), kur tiem novēro reducētas PP, būtiski samazinātu T limfocītu skaitu PP un audos (Maeda et al., 2001). Probiotiku strukturālie elementi (LPS, LTA) ir svarīgi iedzīmtās un adaptīvās imunitātes stimulatori (Dharmani et al., 2009), tādējādi daudzi autori ir ziņojuši par augstāku T limfocītu skaitu PP un LP pēc probiotiku iekļaušanas sivēnu diētā (Smelt et al., 2013; Suthongsa et al., 2017). Vairumā gadījumu

augstāks T limfocītu skaits LP tiek panāks, palielinoties regulējošo T limfocītu skaitam (Suthongsa et al., 2017). Ir ziņojumi par probiotiku lomu palielināt IEL skaitu sivēnu zarnās (Rieger et al., 2015), tā spējot ātri reaģēt uz patogēnu inficētajām vai bojātām šūnām, novēršot to sistēmisku izplatīšanos (Van Wijk & Cheroutre, 2010). Nemot vērā, ka mūsu pētījumā izmantotā probiotikas palielināja T limfocītu skaitu gan zarnu gļotādas imūnsistēmu indukcijas (PP), gan efektoru vietās (LP, IEL), tā vērtējama ar aktīvu imūnmodulējošu efektu.



**2.7. att. / Fig. 2.7. Barības komponentu ietekme uz CD3+ šūnu relatīvo daudzumu ( $\bar{x} \pm SE$ ) tievās zarnas (*jejunum*) Peijera platēs un resnās zarnas (*colon*) zemgлотādā / The effect of feed components on the relative frequency of CD3+ cells in the Peyer's patches of jejunum and in the submucosa of colon**

(a, b, c) atšķirīgi burti nozīmē būtiskas atšķirības starp pētījuma grupām / different letters mean significant differences between the study groups,  $p<0.05$ .

**Probiotiku un griķu kliju kombinācija** palielināja IEL un T limfocītu skaitu LP, galvenokārt resnajā zarnā, kur, domājams, griķu klijas tika fermentētas līdz SCFA, tostarp butirātam (Koh et al., 2016). Butirāts var ietekmēt imūnās šūnas, gan netieši caur mikrobiotas modulāciju, gan tieši – iedarboties uz imūnajām šūnām zarnu gļotādā, palielinot regulējošo T limfocītu skaitu un samazinot efektoro T limfocītu aktivitāti, tādējādi veicinot iedzimto imūno toleranci (Gonçalves et al., 2018; Wu et al., 2017). Interesanti, ka probiotiku+griķu kliju kombinācija nepalielināja IEL skaitu tievajā zarnā, kas varētu atkal liecināt par griķu kliju inhibījējošo iedarbību uz iekļautajām probiotikām.

Mēs novērojām, ka **augu piedeva** samazināja IEL skaitu *jejunum*, taču palielināja T limfocītu skaitu gan interfolikulārajā zonā, gan PP. Savukārt neviennozīmīgs iedarbības efekts tika novērots uz T limfocītu blīvumu LP. No vienas pusēs līdzšinējos ziņojumos ir uzsvērta augu polisaharīdu spēja stimulēt imūnkopētās šūnas PP (Georgiev et al., 2017), taču no otras pusēs ārstnieciskajiem augiem piemīt antibakteriālas īpašības (Field et al., 2017); modulējot vai samazinot baktēriju slodzi, tiek samazināta arī svečveidīgo (*toll-*

*like*) receptoru aktivācija, tādējādi tiek samazināta arī imunitātes stimulācija (Smith & Garrett, 2011), kas varētu izskaidrot samazinātu IEL skaitu un T limfocītu daudzumu LP. Turklat pētījumā izmantotie augi (*P.major* un *H. perforatum*) raksturojas ar spēcīgu pretiekaisuma iedarbību (Albert et al., 2002; Beara et al., 2010), kas savukārt varēja samazināt T limfocītu migrāciju uz bārkstiņu epiteliju (Michiels et al., 2010). IEL un T limfocītu pieaugumu resnās zarnas *colon* daļā, visdrīzāk ietekmēja potenciālais SCFA pieaugums, pateicoties augos esošo polisaharīdu prebiotiskajām īpašībām (Yahfoufi, et al., 2018).

Taukskābju sastāvs ir cieši saistīts ar **galas uzturvērtību**, taču dzīvnieku, īpaši cūku intramuskulārie taukaudi raksturojas ar augstu piesātināto taukskābju saturu. Piesātinātās taukskābes ir riska faktors kardiovaskulārajām slimībām (CVD), turpretī, nepiesātinātās taukskābes uzlabo vielmaiņu, samazina CVD risku, mazina iekaisuma simptomātiku (Shramko et al., 2020).

Analizējot taukskābju saturu *m. longissimus thoracis et lumborum* muskuļaudos, konstatējām, ka P grupas sivēniem ir augstāks ( $p<0.05$ )  $\alpha$ -linolēnskābes un palmitoleīnskābes, bet zemāks ( $p<0.05$ ) stearīnskābes procentuālais daudzums, turklāt novērojām zemāku ( $p<0.05$ ) piesātināto taukskābju saturu un augstāku polinepiesātināto un piesātināto taukskābju attiecību (PUFA:SFA), salīdzinot ar C grupas sivēniem. Probiotiku labvēlīgo ietekmi uz muskuļaudu taukskābju profilu, samazinot piesātināto un palielinot mononepiesātināto un polinepiesātināto taukskābju daudzumu muskuļaudos ir novērojis arī Ross ar līdzautoriem (Ross et al., 2012). Turklat, tikai P grupas sivēnu muskuļaudos PUFA:SFA attiecība bija virs 0.4, kas atbilst veselīga taukskābju profila pamatrādītājam saskaņā ar Apvienotās Karalistes Veselības ministrijas rekomendācijām (Department of Health, 1994).

### **2.3. Ēterisko eļļu (EO) kīmiskā sastāva raksturojums, antibakteriālā darbība un dažādu piedevu ietekme uz EO efektivitāti pret ESBL producējošiem *E. coli***

*Lamiaceae* dzimtas augi tradicionālajā medicīnā ir izmantoti gadsimtiem ilgi, taču arī mūsdienī medicīnā, veterinārmedicīnā un pārtikas rūpniecībā tiem aizvien vairāk tiek pievērsta uzmanība, jo to EO piemīt spēcīga antimikrobiāla, antioksidatīva un pretiekaisuma darbība (Nieto, 2017).

Salīdzinot Latvijas un komerciālo **EO kīmisko sastāvu**, konstatējām, ka komerciālās EO vairumā gadījumu satur augstākā koncentrācijā aromātisko monoterpenoīdu (timols, karvakrols) procentuālo koncentrāciju (30-56%) nekā Latvijas EO (12-37%), izņemot *T. vulgaris* EO, kur to satus būtiski neatšķirās (31% un 30%). Jāuzsver, ka visu Latvijas EO sastāvā būtiski augstāku novērojām  $\gamma$ -terpinēna procentuālo koncentrāciju (17.8-22.4%), savukārt *p*-cimēns biežāk augstākā koncentrācijā tika novērots komerciālajās EO (2.14. tabula).

2.14. tabula / Table 2.14.

**Komerciālo un LV izcelsmes ēterisko eļļu nozīmīgākie ķīmiskie savienojumi\* un identificēto molekulāro klašu kopējais daudzums / The most important chemical compounds and the total number of identified molecular classes of commercial and native essential oils,  $\bar{x} \pm SE$**

RI	Komponentu nosaukumi / Compound name	Saturs/Composition, mg kg <sup>-1</sup> ±SD, (%)					
		<i>Thymus vulgaris</i>		<i>Satureja montana</i>		<i>Thymus serpyllum</i>	
		C	LV	C	LV	C	LV
1165	$\beta$ -mircēns+ $\alpha$ -fellandrēns / $\beta$ -myrcene+ $\alpha$ -phellandrene <sup>1</sup>	38.8±3.4 (1.51)	54.3±2.4 (0.20)	58.0±1.3 (1.14)	172.8±15.2 (3.36)	188.0±17.7 (4.30)	201.7±15.6 (3.43)
1200	limonēns/limonene <sup>1</sup>	91.1±10.1 (3.55)	13.9±0.6 (0.57)	16.4±0.3 (0.32)	44.1±3.0 (0.86)	18.8±0.9 (0.43)	25.3±0.7 (0.43)
1249	$\gamma$ -terpinēns/ $\gamma$ -terpinene <sup>1</sup>	149.0±15.2 (5.81)	437.8±16.3 (17.83)	336.7±8.3 (6.64)	1152.1±50.7 (22.42)	404.4±28.7 (9.24)	1291.0±18.4 (21.93)
1275	<i>p</i> -cimēns/ <i>p</i> -cymene <sup>1</sup>	908.5±35.9 (35.4)	580.2±22.6 (23.63)	660.1±21.9 (13.02)	543.6±42.6 (10.58)	358.0±30.1 (8.18)	526.6±29.7 (8.94)
1548	$\beta$ -linalols/ $\beta$ -linalool <sup>2</sup>	187.5±13.9 (7.31)	88.0±7.0 (3.58)	35.2±1.0 (0.69)	103.5±10.5 (2.01)	138.7±10.0 (3.17)	11.2±0.8 (0.19)
1614	$\beta$ -cariofilēns/ $\beta$ -caryophyllene <sup>4</sup>	42.3±3.6 (1.65)	79.3±4.9 (3.23)	728.6±25.6 (14.37)	173.4±17.4 (3.37)	149.7±10.3 (3.42)	735.4±26.9 (12.49)
1851	<i>trans</i> -geraniols/ <i>trans</i> -geraniol <sup>2</sup>	—	5.2±0.2 (0.21)	6.2±0.2 (0.12)	—	—	492.5±15.9 (8.37)
2143	timols/thymol <sup>3</sup>	684.2±36.9 (26.66)	677.6±36.3 (27.59)	867.3±18.1 (17.10)	72.6±5.9 (1.41)	43.9±2.7 (1.00)	220.3±13.7 (3.74)
2183	karvakrols/carvacrol <sup>3</sup>	78.9±6.2 (3.07)	34.7±2.2 (1.41)	1337.3±8.4 (26.37)	1826.0±69.1 (35.54)	2334.4±46.1 (53.34)	453.1±22.3 (7.70)

2.14. tabulas turpinājums / Continuation of table 2.14.

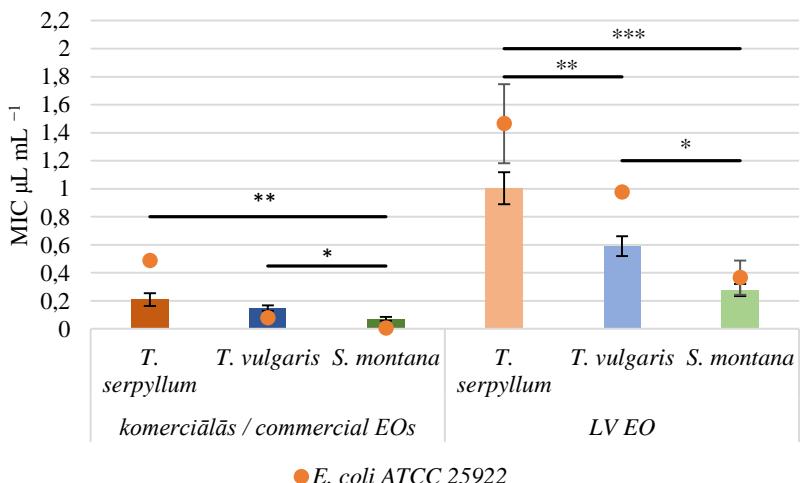
Molekulārās klases / Molecular class:	Saturs / Composition, mg kg <sup>-1</sup> ±SD, (%)					
	<i>Thymus vulgaris</i>		<i>Satureja montana</i>		<i>Thymus serpyllum</i>	
	C	LV	C	C	LV	C
<b>Kopā identificēti / Total identified:</b>	2536.9 (99.70)	2388.7 (99.14)	5041.9 (99.91)	5090.2 (99.59)	4270 (99.6)	5849.1 (99.77)
monoterpēna oglūdeņraži / <i>monoterpene hydrocarbons</i>	1391.0±74.4	1229.6±49.3	1280.5±35.1	2302.3±144	1335.2±105.9	2446.4±90.2
skābekļi saturoši monoterpēni / <i>oxygenated monoterpenes</i>	312.4±22.9	216.7±14.2	339.7±6.2	308.8±28.5	302.5±20.2	1008.4±56.5
aromātiskie monoterpenoīdi / <i>aromatic monoterpenoids</i>	766.4±43.1	749.7±40.2	2233.8±27	1906.1±75	2382.8±48.8	742.6±39.3
seskviterpēna oglūdeņraži / <i>sesquiterpene hydrocarbons</i>	50.1±4.0	93.7±5.7	1029.8±37.1	308.8±28.5	209.6±14.8	1188.5±72.9
skābekļi saturošie seskviterpēni / <i>oxygenated sesquiterpenes</i>	12.4±0.9	20.1±0.9	51.3±0.9	23.7±1.2	21.4±0.8	263.8±19.7
alifātiskie aldehīdi un ketoni / <i>aliphatic aldehydes &amp; ketones</i>	—	4.9±0.1	4.4±0.1	4.5±0.1	—	30.7±0.7
alifātiskie spirti / <i>aliphatic alcohols</i>	—	46.7±3.1	75.9±1.4	191.8±24.1	14.7±0.4	57.3±2.1
esteri/ <i>esters</i>	4.6±0.2	27.5±0.9	26.6±0.8	53.6±4.8	3.8±0.9	111.5±8.6
<b>Timols/<i>Thymol</i> **</b>	<b>836.1±44.4</b>	<b>828.0±44.0</b>	<b>1056.1±21.8</b>	<b>100.0±7.1</b>	<b>65.36±3.3</b>	<b>278.41±16.5</b>

\* – Tabulā nav atainoti visi identificētie ķīmiskie komponenti / In the table not shown all of the identified chemical components. \*\* – aprēķināts pēc timola ārējās kalibrācijas / calculated by external calibration of thymol. RI – aprēķinātais aiztures indekss / retention index calculated. C – komerciālās ēteriskās eļļas / commercial essential oils, LV – eļļas no vietējiem augiem (Latvijas) / essential oils of native plants (Latvian). Augšrakstā/Superscript<sup>1-8</sup> – molekulārās klases / Molecular class: 1 – monoterpēna oglūdeņraži / *monoterpene hydrocarbons*, 2 – skābekļi saturoši monoterpēni / *oxygenated monoterpenes*, 3 – aromātiskie monoterpenoīdi / *aromatic monoterpenoids*, 4 – seskviterpēna oglūdeņraži / *sesquiterpene hydrocarbons*

Autori (Ložionė & Venskutonis, 2006) ir ziņojuši, ka ziemēļu klimats negatīvi ietekmē gaistošo fenola savienojumu sintēzi, kas no vienas puses varētu izskaidrot zemāku timola un karvakrola procentuālo koncentrāciju arī mūsu iegūtajās EO. Taču no otras puses, mēs nenovērojām būtiskas atšķirības starp kopējo aromātisko gaistošo vielu daudzuma Latvijas un komerciālajā *T. vulgaris* EO, tāpēc, domājams, ka augu ģenētika, nevis klimats, galvenokārt varētu ietekmēt aromātisko gaistošo savienojumu sintēzi augos.

Saskaņā ar EO **antibakteriālās darbības rezultātiem** visas pētījumā analizētās EO raksturojās ar baktericīdu darbību, jo nenovērojām būtiskas atšķirības starp EO minimālo inhibējošo koncentrāciju (MIC) un minimālo baktericīdo koncentrāciju (MBC) attiecībā pret references un fekālajiem *E. coli*.

EO antibakteriālo efektivitāti pret *E. coli* būtiski ietekmē tādi faktori kā EO izcelstsme (komerciālā, Latvijas) un augu sugas veids. Latvijas EO bija augstākas ( $p<0.001$ ) MIC vērtības, salīdzinot ar komerciālajām EO, turklāt novērojām būtiskas ( $p<0.001$ ) atšķirības starp EO augu sugām. No Latvijas EO viszemākā MIC vērtība bija *S. montana*, bet visaugstākā – *T. serpyllum*, savukārt no komerciālajām EO viszemākā MIC vērtība bija *S. montana*, taču nenovērojām būtiskas atšķirības starp *T. vulgaris* un *T. serpyllum* (2.8. attēls).



2.8. att. / Fig. 2.8. Komerciālo un Latvijas ēterisko eļļu (LV EO) MIC vērtību ( $\bar{x}\pm SE$ ) salīdzinājums pret references *E. coli* ATCC 25922 un *E. coli*, izolētiem no cūku fekālijām / Comparison of MIC values ( $\bar{x}\pm SE$ ) of commercial and Latvian (LV EOs) essential oils against reference *E. coli* ATCC 25922 and pigs' faecal *E. coli*

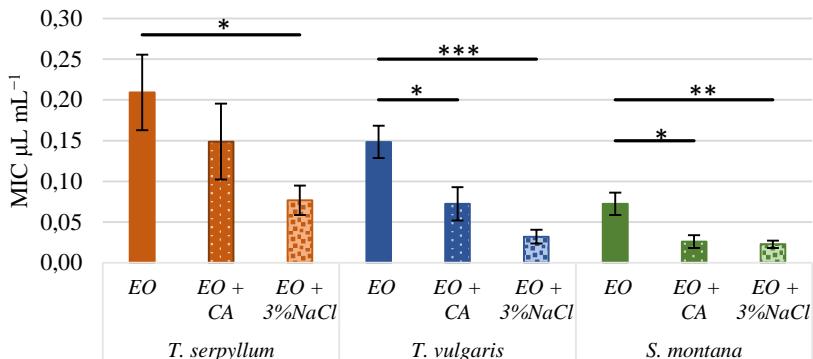
\* $p<0.05$ ; \*\*  $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$ .

Citi pētnieki ir ziņojuši, ka skābekli nesaturoši oglūdeņraži ir vājas antibakteriālās aktivitātes indikatori EO (Guimaraes et al., 2019). Nemot vērā, ka Latvijas EO raksturojās ar  $\gamma$ -terpinēnu pārpilnību, tas izskaidro šo EO samazinātu antibakteriālo aktivitāti. Skābekli nesaturošie monoterpēni samazina skābekli saturošo terpēnu šķīdību ūdenī, kā rezultātā rada antagonisku darbības efektu pret skābekli saturošiem monoterpēnu oglūdeņražiem (Cox et al., 2001).

Savukārt *p*-cimēna salīdzinoši augstā koncentrācija komerciālajās EO lielā mērā ir veicinājusi antibakteriālo aktivitāti pret *E. coli*. *P*-cimēna un karvakrola sinerģiskais efekts ir apstiprināts arī citos pētījumos (Ultee et al., 2002), kur *p*-cimēna hidrofobās īpašības veicina karvakrola penetrāciju cauri baktēriju šūnas membrānai, tā sekmējot baktērijas šūnas membrānas destabilizāciju un karvakrola inhibējošo aktivitāti (Rattanachaikunsopon & Phumkhachorn, 2010; Ultee et al., 2002).

Neskatoties uz to, ka pētījumā izmantotā Latvijas un komerciālā *T. vulgaris* EO uzrādīja līdzvērtīgu aromātisko, skābekli saturošo un skābekli nesaturošo monoterpēnu daudzumu, tomēr abu EO antibakteriālā aktivitāte būtiski atšķirās. Šis novērojums atklāj skaitliski mazākumā esošu atsevišķu molekulu spēju būtiski ietekmēt EO antibakteriālo darbību. Piemēram, komerciālā *T. vulgaris* EO saturēja lielāku limonēna un  $\beta$ -linalola procentuālo daudzumu, kuriem piemīt spēcīga antibakteriālā darbība (Cosentino et al., 1999; Guimaraes et al., 2019), turklāt nevar izslēgt timola un  $\beta$ -linalola un/vai limonēna sinerģiju, kā tas bija novērojams karvakrola un *p*-cimēna savstarpējās mijiedarbības gadījumā. Tāpat mazākumā esošas atsevišķas molekulas spēja būtiski ietekmēja arī *T. serpyllum* EO darbību, kur neskatoties uz to, ka tā saturēja ļoti augstu karvakrola koncentrāciju (53.34%, 2334mg kg<sup>-1</sup>), tomēr tās antibakteriālā aktivitāte bija ie�erojami zemāka, nekā gaidīts. Līdzīgu fenomenu novēroja arī Vesolowska ar līdzautoriem (Wesolowska et al., 2015), ierosinot, ka tas varētu būt EO atsevišķu savienojumu antagoniskas mijiedarbības rezultāts. Piemēram, Gallucci ar līdzautoriem ir ziņojis, ka karvakrols un  $\beta$ -mircēns mijiedarbojoties izraisa antagonisku efektu uz antibakteriālo darbību pret *E. coli* un Gram pozitīvajām baktērijām (Gallucci et al., 2009). Jāuzsver, ka vislielāko  $\beta$ -mircēna daudzumu mēs konstatējām tieši komerciālajā *T. serpyllum* EO.

Balstoties uz mūsu pētījuma rezultātiem, vienas pašas piedevas – gan 3% NaCl, gan arī 1mM kaprilskābe neizraisīja *E. coli* augšanas nomāšanu vai bakterīcīdo efektu ne pret vienu no pētījumā iekļautajiem *E. coli*, taču tai pašā laikā, **komerciālo EO papildināšana** ar 3% NaCl ( $p<0.001$ ) vai 1 mM kaprilskābi ( $p=0.012$ ) būtiski palielināja to antibakteriālo darbību pret *E. coli*. Papildinot *T. serpyllum*, *T. vulgaris* un *S. montana* EO ar kaprilskābi, MIC vērtība samazinājās attiecīgi par 29% ( $p=0.810$ ), 51% ( $p=0.011$ ) un 64% ( $p=0.017$ ), savukārt, papildinot šīs pat EO ar 3% NaCl, MIC vērtība samazinājās attiecīgi par 63% ( $p=0.018$ ), 78% ( $p<0.001$ ) un 69% ( $p=0.001$ ) (2.9. attēls).



2.9. att. / Fig. 2.9. Kaprilskābes (CA) un 3% NaCl piedevu ietekme uz komerciālo ēterisko eļļu (EO) antibakteriālo darbību (MIC,  $\bar{x}\pm SE$ ) pret cūku fekāliem *E. coli* / The effect of caprylic acid (CA) and 3% NaCl supplements on the antibacterial activity (MIC,  $\bar{x}\pm SE$ ) of commercial essential oil (EO) against pigs' faecal *E. coli*

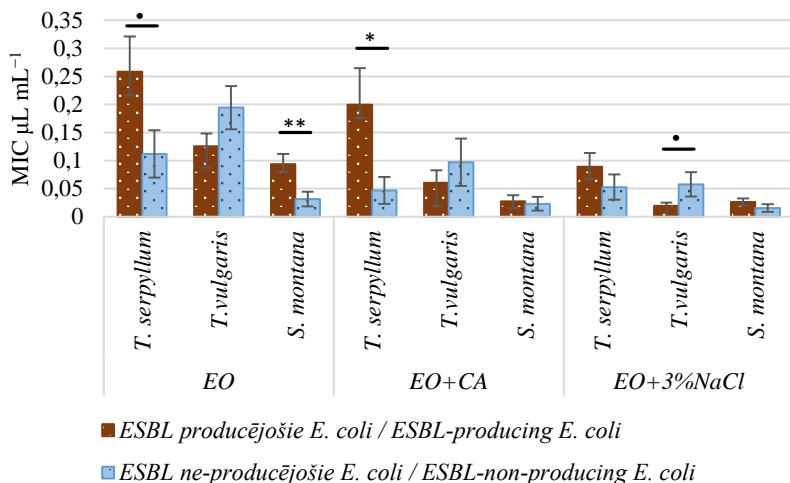
\*p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\*p<0,001

Kaprilskābe ir piesātināto taukskābju pārstāvis, kuras antibakteriālo aktivitāti raksturo taukskābju spēja mijiedarboties ar baktēriju šūnas membrānām (Yoon et al., 2018) un izjaukt elektronu pārneses reakcijas, kā arī izraisīt traucējumus oksidatīvās fosforilācijas procesos (Desbois & Smith, 2010; Yoon et al., 2018). Mūsu pētījuma rezultāti saskan ar citu pētnieku ziņojumiem, ka pastāv sinerģiska mijiedarbība starp EO/fenoliem un vidējo kēžu taukskābēm (MCFA) (Hulánková & Bořilová, 2011; S. A. Kim & Rhee, 2016; Rani et al., 2022); tādējādi vēlamās antibakteriālās darbības nodrošināšanai ir nepieciešams izmantot zemāku EO koncentrāciju, ja to lieto kopā ar kaprilskābi.

Zināms, ka augsts ārējais osmotiskais spiediens, ko rada hipertoniska vide, veicina baktērijām osmotisko šoku (Wood, 2015), taču, mūsu pētījuma rezultāti apliecinā, ka *E. coli* spēj veiksmīgi izdzīvot un pat augt paaugstinātās osmolaritātēs vidē (3% NaCl). Tomēr, baktēriju šūnā esošās enerģijas novirzīšana uz osmoregulācijas sistēmām ir veicinājusi EO iedarbību hipertoniskā vidē. EO aromātisko monoterpenoīdu hidrofobitāte veicina to uzkrāšanos baktērijas citoplazmatiskās membrānas fosfolipīdu dubultslānī un palielina tās caurlaidību (Ben Arfa et al., 2006), savukārt aromātisko monoterpenoīdu molekulā esošā brīvā hidrosilgrupa ietekmē jonu apmaiņas reakcijas, samazinot baktērijām vitāli svarīgā adenozīntrifosfāta sintēzi un, izsīkstot šīm enerģijas rezervēm, tiek ierosināta baktēriju šūnas nāve (Ben Arfa et al., 2006; Ultee et al., 2002). Mūsu pētījuma rezultāti apstiprina, ka 3% NaCl

lietošana kopā ar EO būtiski samazina nepieciešamo EO koncentrāciju antibakteriālās darbības nodrošināšanai pret *E. coli*.

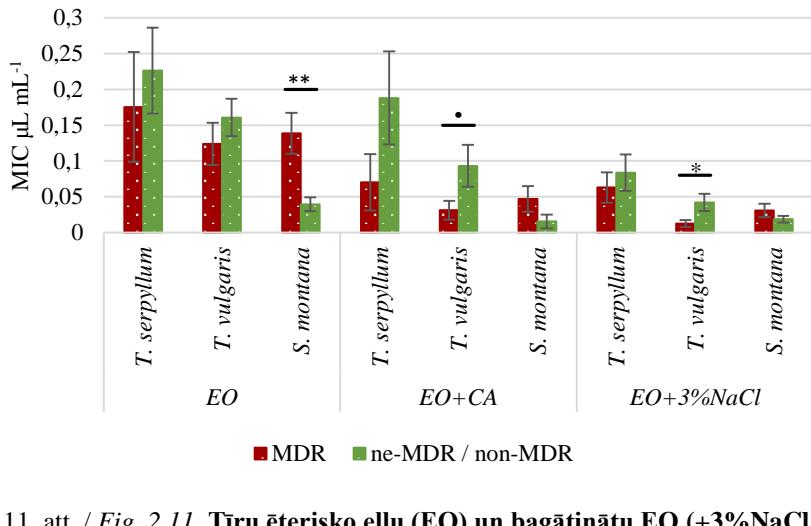
Salīdzinot katras EO (ar/bez piedevām) efektivitāti **pret ESBL producējošiem un ESBL ne-producējošiem *E. coli***, tika konstatēts, ka tīrajai *S. montana* EO ir būtiski zemākas MIC vērtības pret ESBL ne-producējošiem *E. coli* salīdzinot ar ESBL producējošiem *E. coli*, līdzīga tendence tika novērota arī *T. serpyllum* EO gadījumā. Savukārt *T. vulgaris* EO, kas papildināta ar 3% NaCl piedevu, bija tendence būt zemākām MIC vērtībām pret ESBL producējošiem *E. coli* nekā ESBL ne-producējošiem *E. coli*, turklāt pārējās papildinātās EO bija vienlīdz efektīvas gan pret ESBL producējošiem, gan ESBL ne-producējošiem *E. coli* (2.10. attēls).



2.10. att. / Fig. 2.10. Tīru ēterisko eļļu (EO) un bagātinātu EO (+3%NaCl, +CA) antibakteriālās aktivitātes (MIC,  $\bar{x} \pm SE$ ) salīdzinājums pret ESBL producējošajiem un ESBL ne-producējošiem *E. coli* / Comparison of the antimicrobial activity (MIC,  $\bar{x} \pm SE$ ) of pure essential oils (EO) and enriched EO (+3%NaCl, +CA) against ESBL-producing *E. coli* and ESBL-non-producing *E. coli*

CA – kaprilskābe/caprylic acid, •  $p=0.05-0.10$ ; \*  $p<0.05$ ; \*\*  $p<0.01$ .

Salīdzinot katras EO (ar/bez piedevām) antibakteriālās darbības efektivitāti **pret MDR un ne-MDR *E. coli***, konstatējām, ka tīra *S. montana* EO bija būtiski efektīvāka pret ne-MDR *E. coli*, taču gan ar kaprilskābi ( $p=0.061$ ), gan ar 3% NaCl ( $p=0.032$ ) papildināta *T. vulgaris* EO bija efektīvāka pret *E. coli* ar augstāku rezistences līmeni, t.i. pret MDR *E. coli* nekā ne-MDR *E. coli* (2.11. attēls).



2.11. att. / Fig. 2.11. Tīru ēterisko eļļu (EO) un bagātinātu EO (+3%NaCl, +CA) antibakteriālās aktivitātēs ( $MIC$ ,  $\bar{x} \pm SE$ ) salīdzinājums pret multirezistentaļiem (MDR) un ne-MDR *E. coli* / Comparison of the antimicrobial activity ( $MIC$ ,  $\bar{x} \pm SE$ ) of pure essential oils (EO) and enriched EO (+ 3%NaCl, +CA) against multi-drug resistant (MDR) *E. coli* and non-MDR *E. coli*

CA – kaprilskābe/caprylic acid •  $p=0.05-0.10$ ; \*  $p<0.05$ ; \*\*  $p<0.01$ .

ESBL producējošo *E. coli* rezistence ir saistīta ne tikai ar hidrolizējošo  $\beta$ -laktamāžu klātbūtni, bet arī ārējās membrānas samazināto caurlaidību porīnu zuduma vai modifikācijas dēļ (Khalifa et al., 2021; Pagès et al., 2008). Turklāt izplūdes sūkņi (eflukss) ir izplatīts MDR baktēriju rezistences mehānisms, kam arī piemīt fizioloģiskas funkcijas, īpaši stresa apstākļos, reagējot uz vides un fizioloģiskajiem signāliem (Sun et al., 2014). Mūsuprāt, membrānas caurlaidības samazināšanās ESBL producējošajiem *E. coli* un izplūdes sūkņa klātbūtne MDR *E. coli* varēja būt galvenie iemesli, kas izraisīja dažu tīru EO zemāku aktivitāti.

Mūsu pētījumā ar kaprilskābi vai NaCl piedevu bagātinātās EO bija vienlīdz efektīvas pret ESBL un ne-ESBL, kā arī MDR un ne-MDR *E. coli*. Turklāt konstatējām, ka ar NaCl bagātinātā *T. vulgaris* EO ir efektīvāka pret *E. coli* ar augstāku rezistences līmeni. Tas liecina, ka bagātinātās EO spēj iedarboties uz baktēriju šūnu vispusīgāk un tas savukārt varētu būt sekmīgāks risinājums, lai apietu baktēriju rezistences mehānismus. Citi autori ir novērojuši arī citus labvēlīgus NaCl saturošu šķidumu efektus, piemēram, ka samazina biomembrānu veidošanos un baktēriju kustīgumu (F. Li et al., 2021), savukārt sāls šķiduma radītais abiotiskais stress varētu veicināt plazmīdu elimināciju un inhibīciju horizontālajā plazmīdu pārnesē (L. Tan et al., 2019).

## SECINĀJUMI

1. Cūkkopības saimniecībās komensiālajam *E. coli* ir ļoti augsts rezistences līmenis pret tetraciklinu (54.63%), augsts – pret ampicilīnu (32.03%), trimetoprimu (24.07%), sulfametoksazolu-trimetoprimu (22.44%) un amoksicilīnu-klavulānskābi (22.28), bet zems – pret fluorohinaloniem (enrofloksacīnu (8.78%), ciprofloksacīnu (3.58%)), gentamicīnu (5.69%), cefazolīnu (4.55%) un trešās paaudzes cefalosporīniem (cefotaksīmu (1.46%)). Antibiotiku rezistentos *E. coli* biežāk izolējām lielajās saimniecībās un cūkām no 4 līdz 12 nedēļu vecumam, kas norāda uz plašāku dažādāka spektra antibiotiku lietojumu lielajās saimniecībās un attiecīgajā cūku audzēšanas posmā.
2. Ar selektīvi diferenciālo metodi konstatējām salīdzinoši augstu (23.4%) ESBL producējošā *E. coli* izplatību cūkkopības saimniecībās, turklāt biežāk tā klātbūtni konstatējām sivēnmātēm (41.6%) un sešas nedēļas veciem sivēniem (35.1%). Lai arī biežāk un augstāku ESBL producējošā *E. coli* sastopamību novērojām lielajās saimniecībās (līdz 64%), tomēr arī mazajās saimniecībās var konstatēt augstu (47.5%) tā klātbūtni, norādot, ka saimniecības lielums ne vienmēr ir noteicošais faktors rezistento baktēriju augstākai izplatībai.
3. Starp ESBL producējošiem *E. coli* ir novērojama ļoti augsta (96%) multirezistences izplatība, turklāt lielajās saimniecībās tie raksturojas ar plašākiem rezistences fenotipiem. Plaša amoksicilīna, cefalosporīnu, fluorohinolonu lietošana, kā arī cinka oksīda pievienošana barībai varētu būt veicinošie faktori multirezistento ESBL producējošo *E. coli* izplatībai saimniecībās.
4. Latvijas cūkkopības saimniecībās visbiežāk konstatētie ESBL kodējošie gēni bija *blaTEM* (94%) un *blaCTX-M* (86%), retāk *blaSHV* (48%). Mazajā saimniecībā ievērojami biežāk novērojām *blaSHV*, savukārt lielajās – *blaCTX-M*. Konstatējām statistiski nozīmīgas asociācijas starp gēnu *blaSHV* un rezistenci pret ceftazidīmu, cefiksīmu un amoksicilīnu-klavulānskābi, bet gēnam *blaCTX-M* – pret cefotaksīmu, cefaleksīnu un vairākām ne-β-laktāma antibiotikām, tādējādi apstiprinot faktu, ka ESBL kodējošie gēni bieži ir inkorporēti starp citiem rezistenci noteicošajiem gēniem.
5. Probiotikas saturošās papildbarības “ProbioHelp” iekļaušana barības devā samazināja ( $p<0.05$ ) *Enterobacteriaceae* (vidēji par 49%) un *E. coli* (vidēji par 43%) skaitu ( $\log \text{kvv g}^{-1}$ ) fekālijās sivēniem jau 35. dzīves dienā, savukārt pētījuma noslēgumā (sivēnu 56. dzīves dienā) konstatējām zarnu saturā *Lactobacillus* spp. skaita ( $\log \text{kvv g}^{-1}$ ) pieaugumu ( $p<0.05$ ) vidēji par 23%, salīdzinot ar kontroles grupas dzīvniekiem.

6. Augu (*Plantago major*, *Urtica dioica*, *Hypericum perforatum* 1:1:1) izcelsmes barības sastāvdaļu pievienošana sīvēnu barībai ne tikai samazināja ( $p<0.05$ ) *Enterobacteriaceae* (vidēji par 39%) un *E.coli* (vidēji par 36%) skaitu (log  $\text{kvv g}^{-1}$ ) fekālijās sīvēnu 56. dzīves dienā, salīdzinot ar kontroles grupas dzīvniekiem, bet samazināja arī rezistento *E. coli* fenotipisko dažādību, tādējādi to iekļaušana barības devā varētu sekmēt antibakteriālās rezistences izplatības ierobežošanu cūkkopības saimniecībās.
7. Probiotikas saturoša papildbarība "ProbioHelp" palielināja ( $p<0.05$ ) *jejunum* bārkstiņu garumu, VH:CD attiecību, enterocītu proliferāciju, skābo mucīnu producējošo kausveida šūnu skaitu tievajā un tendenciozi arī resnajā zarnā; savukārt augstāks ( $p<0.05$ ) intraepiteliālo limfocītu blīvums zarnās, kā arī T limfocītu relatīvais daudzums Peijera platēs un *lamina propria* daļā, salīdzinot ar kontroles grupu, var liecināt par papildbarības imūnmodulējošo iedarbību.
8. Augu izcelsmes barības sastāvdaļu (*Plantago major*, *Urtica dioica*, *Hypericum perforatum* 1:1:1) pievienošana sīvēnu barībā palielināja ( $p<0.05$ ) *jejunum* bārkstiņu garumu, VH:CD attiecību un epitēlijā šūnu proliferāciju; savukārt zemāks ( $p<0.05$ ) intraepiteliālo limfocītu blīvums *jejunum*, kā arī augstāks ( $p<0.05$ ) T limfocītu relatīvais daudzums Peijera platēs, resnās zarnas *lamina propria* daļā, salīdzinot ar kontroles grupu, var norādīt uz augu izcelsmes sastāvdaļu pretiekaisuma un imūnmodulējošām īpašībām.
9. Latvijas izcelsmes *T. serpyllum*, *T. vulgaris* un *S. montana* ēteriskās eļļas uzrāda augstākas ( $p<0.05$ ) MIC un MBC vērtības pret *E. coli*, kas skaidrojams ar sastāvā salīdzinoši augsto oglūdeņražu monoterpēnu klātbūtni, norādot uz Latvijas izcelsmes ēterisko eļļu augstākas koncentrācijas nepieciešamību antibakteriālās efektivitātes nodrošināšanai.
10. *T. serpyllum*, *T. vulgaris* un *S. montana* komerciālo ēterisko eļļu bagātināšana ar kaprilskābi ļauj samazināt nepieciešamo minēto eļļu patēriņu attiecīgi par 29%, 51% un 64%, bet, bagātināšana ar 3% NaCl – attiecīgi par 63%, 78% un 69%. Bagātinātā *T. vulgaris* ēteriskā eļļa uzrādīja tendenci augstākai efektivitātei pret ESBL producējošiem *E. coli*, salīdzinot ar antibiotiku jutīgiem *E. coli* celmiem, tādējādi timiāna ēterisko eļļu varētu sekmīgi izmantot multirezistento *E. coli* kontrolē.

## PRAKTISKĀS REKOMENDĀCIJAS

1. Lai novērstu ESBL producējošu baktēriju strauju izplatību cūkkopības saimniecībās, ir nepieciešams veikt skrīningu uz ESBL producējošā *E. coli* klātbūtni, īpaši, ja saimniecībā sivēniem bieži konstatē diareju, profilaktiski perorāli tiek lietots cinka oksīds vai ārstēšanā tiek izmantotas fluorohinolonu un  $\beta$ -laktāmu grupas antibiotikas.
2. Lai samazinātu ESBL producējošo baktēriju izplatību produktīvajiem dzīvniekiem, rekomendējam kritiski svarīgas antibiotikas (3. un 4. paaudzes cefalosporīnus, fluorohinolonus) lietot tikai tad, ja zemākā kategorijā nav alternatīvu antibiotiku un lietošanas nepieciešamība ir pamatota ar antibiotiku jutīguma pārbaudes rezultātiem.
3. Rekomendējam augu (*Plantago major*, *Urtica dioica*, *Hypericum perforatum* 1:1:1) saturošu barības sastāvdaļu pievienošanu 1.5% apjomā sivēniem pamatbarībai no 14.-56. dzīves dienai, lai modulētu zarnu mikrobiotu adaptīvajā sivēnu atšķiršanas periodā, uzlabotu zarnu veselību un sekmētu imūnmodulējošo darbību zarnu traktā. Ārstniecības augu piedeva ne tikai samazina fekālijās esošo *E. coli* skaitu, bet arī rezistento izolātu fenotipisko dažādību.
4. Bagātinot ēteriskās eļļas ar 1mM kaprilskābes vai 3% NaCl piedevu, būtiski var samazināt nepieciešamās ēteriskās eļļas daudzumu.
5. Rekomendējam bagātināto *T. vulgaris* ēterisko eļļu izmantot virsmu dezinfekcijas līdzekļu izstrādē kā ESBL producējošā *E. coli* kontroles komponentu.

## INTRODUCTION

*Escherichia coli* is a facultative anaerobic bacterium, widely represented in the intestinal tract of most animal species. In young animals, *E. coli* is commensal – quickly colonizes the intestinal tract and becomes part of the normal microbiota, but some *E. coli* strains are pathogenic.

The most important for pigs are: Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC), shiga-toxigenic *E. coli* (STEC) and extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC), including septicemic ones *E. coli* (SEPEC) strains. Particularly relevant for suckling and weaned piglets is colibacteriosis caused by enterotoxigenic *E. coli* strains. Fast-growing piglets are affected by hemolytic (STEC) *E. coli*, which causes piglet Edema disease. ExPEC and EPEC are like opportunistic pathogens and are part of the normal intestinal microflora (Gyles & Fairbrother, 2010).

*E. coli* pathogenicity is associated with virulence genes encoded in mobile genetic elements (Gyles & Fairbrother, 2010). In addition, predisposing factors play an important role, ie insufficient passive immunity, inadequate hygiene, neonatal status and stress factors such as piglet weaning and for intensive pig farming, which is the dominant way of farming in the world and in Latvia particularly. The high density of pigs and the sensitivity of animals of this specie to stress factors contribute to the concentration and transmission of diseases.

Pig farmers traditionally have tried to improve protective functions of the digestive tract by using antibiotics as growth promoters (Cromwell, 2002), but this has also contributed to bacterial resistance to antibacterial products (Cantón & Ruiz-Garbajosa, 2011). For *Enterobacteriaceae* bacteria of the digestive tract, including *E. coli* is characteristic conjugation or horizontal resistance transfer mechanism, which allows to exchange plasmids both within their own bacterial specie or to other species. Plasmids often incorporate many resistance genes, so bacteria can quickly develop multidrug resistance (Boerlin & White, 2013).

Due to growing concerns about the global spread of antibiotic-resistant bacteria and the risk they pose to public health, the use of antibiotics as growth promoters in animals, including pigs, has been banned since 2006. Despite the fact that the use of antibiotics as growth promoters is forbidden in the European Union, the works of several researchers (Bednorz et al., 2013; Haenni et al., 2014; Von Salviati et al., 2014) show the high prevalence and increasing relevance of resistant *E. coli*. Particular attention is payed to extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *E. coli*, whose secreted enzymes hydrolyze and inactivate most of the  $\beta$ -lactam antibiotics, including 3rd and 4th generation cephalosporins. The last ones are recognized by the the World Health Organization as the "critically important antibiotics in humanitarian medicine".

The World Health Organization in it's 2014 annual overview report on antibiotic resistance identifies it as the "greatest global threat" to human health,

as antibacterial resistance continues to grow, creating the risk of development of "postantibiotic era" when people die from simple infections that have been treatable for decades (WHO, 2015).

In addition, as reported by *Global Trends* about the use of antibiotics in food producing animals, pigs have the highest consumption of antimicrobials per kilogram of live weight, ahead of chickens and cattle (Van Boeckel et al., 2015). Most importantly, the release of resistant bacteria from the macroorganism pollutes the environment, thereby endangering other animals and humans, and as pigs are productive animals, there is a high risk of resistant bacteria entering the food chain (WHO, 2015).

The ban on antibiotics as growth promoters has created a need for effective alternative solutions (Liu et al., 2018; Stein & Kil, 2006). Our study focused on the effect of probiotic-containing supplementary feed and plant-based animal feed ingredients both on the health of piglets and their intestines, and also on the effect on prevalence of resistant of *E. coli* in faeces. In our opinion, a comparison *in vitro* of the antibacterial efficacy of essential oils against porcine *E. coli* isolates of different resistance levels would facilitate their wider use in control of resistant *E. coli* in animals.

#### **The theses to be defended:**

1. in Latvian pig farms there is a high prevalence of antimicrobial resistant *E. coli*, moreover, it differs significantly between farms and age groups of pigs;
2. in some pig farms there is a high incidence of ESBL-producing *E. coli*, often with extensive multidrug-resistant (MDR) phenotypes;
3. for individual ESBL coding genes are observed positive associations with phenotypic resistance caused by certain antibiotics, in addition, the presence of the gene *bla* CTX-M provides *E. coli* with extensive MDR phenotypes;
4. feed components of natural origin (probiotics, probiotics+buckwheat bran, herbal supplement) improve the health of piglets and their intestines – by modulating the intestinal microbiota, improving the histomorphological indicators of the intestinal mucosa and affecting the distribution of T lymphocytes in the mucosa of the small intestine, Peyer's patches. The plant-based feed components reduce the number of *E. coli* and its diversity of phenotypic resistance;
5. the essential oils of plants of the *Lamiaceae* family grown in Latvia are characterized by a lower antibacterial activity against pig commensals *E. coli* than commercial essential oils;
6. antibacterial activity of commercial essential oils against *E. coli* is significantly improved by enriching them with caprylic acid or addition of 3% NaCl.

**The hypothesis put forward in the thesis:** bacteria *Escherichia coli* resistance to antibiotics is highly widespread in pig farming farms in Latvia and the use of probiotics, as well as herbal products, could limit the spread of *E. coli* and ESBL-producing *E. coli*.

**The purpose of the thesis:** to study the prevalence of resistant *Escherichia coli* in pigs in Latvia, to evaluate the possibilities of its reduction by using feed components and means of natural origin.

**Tasks of the doctoral thesis** set to achieve the goal:

1. find out the prevalence of the resistant to antibiotics *Escherichia coli* in pig farms in Latvia. To identify extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *E. coli* occurrence in pigs;
2. evaluate the effect of supplementary feed containing probiotics and feed components of plant origin on the health of piglets and their intestines – prevalence of resistant *E. coli*, intestinal microbiota, histomorphological and immunological condition, meat quality;
3. to compare the antibacterial activity of Latvian and commercial essential oils *in vitro* against porcine faecal extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *E. coli*, as well as to evaluate the use of essential oils enriched with caprylic acid and sodium chloride in the control of this resistant *E. coli*.

**The scientific novelty of the study:**

1. obtained original data on the occurrence of antibiotic-resistant, multidrug-resistant and extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *E. coli* in pig farms in Latvia, the differences in their prevalence in large and small farms and in pigs of different ages;
2. obtained original data on ESBL-producing *E. coli* phenotypic resistance, as well as the prevalence of multidrug resistance phenotypes among ESBL-producing *E. coli* isolated from pigs in Latvia;
3. we determined the *E. coli* most common ESBL coding genes (*bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>* and *bla<sub>SHV</sub>*), the differences in their distribution in large and small pig farms;
4. obtained original data on statistically significant associations between ESBL-coding genes and phenotypically detected antibiotic resistance of *E. coli* from pig faeces;
5. obtained original data how the use of complementary feed "ProbioHelp", probiotic+buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) bran and the herbal supplement (*Plantago major*, *Urtica dioica*, *Hypericum perforatum* 1:1:1) in 4-56-day-old piglets effect the:
  - a. changes of intestinal content and faecal microbiota,
  - b. prevalence of resistant *E. coli*,

- c. measurements of histomorphological structure of the mucosa of small and large intestinal,
  - d. the number of goblet cells and their secreted mucins,
  - e. proliferation of epithelial cells (Ki67) and infiltration of T lymphocytes (CD3 positive cells) in the structures of the small and large intestine mucosa, submucosa and Peyer's patches, as well as
  - f. certain effects on the content of fatty acids in muscle tissue;
6. for the first time in Latvia, the antibacterial effectiveness of the essential oils of commercially available plants grown in Latvia (*T. serpyllum*, *T. vulgaris* and *S. montana*) against commensals was determined and compared *E. coli* isolated from pigs; the effect of the chemical composition of these essential oils on the antibacterial activity was assessed;
7. for the first time, the antibacterial activity of commercial essential oils (*T. serpyllum*, *T. vulgaris* and *S. montana*) enriched with caprylic acid and 3% NaCl was evaluated against commensal *E. coli* derived from pigs; determined the antibacterial efficiency of these combinations against different resistance levels of *E. coli* (ESBL-producing/non-producing *E. coli* and multidrug-resistant/ non-multidrug-resistant *E. coli*).

**Personal contribution:**

1. bacteriological examination of faecal samples (commensal indicator bacteria *E. coli* isolation and biochemical confirmation; testing samples for the presence of ESBL-producing *E. coli*, their phenotypic confirmation; *E. coli* and ESBL-producing *E. coli* determination of antimicrobial sensitivity (antibiotic resistance) against 12 and 18 antibiotics, respectively, preparation of isolated cultures for long-term storage);
2. collection of medicinal plants, preparation of a herbal supplement containing them for the implementation of the piglet feeding study;
3. bacteriological examination of the faeces and intestinal contents of obtained piglets (*Enterobacteriaceae*, *E. coli* and *Lactobacillus* spp. determination of the number, isolation of *E. coli* and determination of its antimicrobial sensitivity (antibiotic resistance);
4. wild and cultivated medicinal plants in Latvia (*T. vulgaris*, *T. serpyllum* and *S. montana*) extraction, extraction of essential oils using the hydrodistillation method;
5. examination of the antibacterial activity of Latvian and commercial essential oils, as well as commercial enriched (with caprylic acid and NaCl) essential oils *in vitro*.

## **1. MATERIAL AND METHODOLOGY**

### **1.1. Study time, place and study scheme**

The doctoral research was developed in three activities in the period from 2014 to 2022 – at the Institute of Food and Environmental Hygiene of the Faculty of Veterinary Medicine of the LLU and the Department of Molecular Biology and Microbiology of the Scientific Laboratory of Biotechnology of the LLU.

In order to determine the prevalence of antibiotic-resistant and ESBL-producing *E. coli* in pigs, in the first activity of the study we obtained samples of pig faeces in seven pig farms in three regions of Latvia – Vidzeme, Pierīga and Zemgale. We carried out the bacteriological and molecular biological examination of the samples at the Department of Molecular Biology and Microbiology of the Scientific Laboratory of Biotechnology of the LLU (LLU BZL MBMN).

In order to evaluate the possibilities of reducing resistant and ESBL-producing *E. coli* in pig farming farms, two more activities were carried out – piglet feeding study (second activity) and development of active substance components for potential environment treatment agents (Third activity).

In the second research activity, in one pig farm in the Pierīga region, we carried out a piglet feeding study. We fed the piglets with three different feed supplements of natural origin – probiotic-containing "ProbioHelp" (hereinafter referred to as probiotics), probiotics+buckwheat bran and herbal supplement. In the blood samples obtained during the activity, hematological and biochemical parameters were determined in the laboratory of the Veterinary Clinic of the LLU. We performed the bacteriological examination of piglet faeces and digestive content samples at the LLU BZL MBMN. Histological preparations of tissues were prepared in the Laboratory of Comparative Pathology of the Preclinical Institute of the Faculty of Veterinary Medicine of the LLU, while immunohistochemical preparations of tissues were prepared in the Pathology Center of Riga Eastern Clinical University Hospital. Histopathological evaluation of histological preparations was performed in the Microbiology and Pathology Laboratory of the Scientific Institute of Food Safety, Animal Health and Environment "BIOR". Histomorphological measurements and immunohistochemical evaluation of tissue sections we performed at the LLU BZL MBMN. The content of fatty acids in pig musculature was determined in the Chemistry laboratory of the scientific institute "BIOR".

In the third research activity, we obtained essential oils (EOs) of wild plants and plants grown in Latvia in the Laboratory of Processing of Forest raw Materials of the Latvian State Institute of Forestry "Silava", while the chemical composition of plant EOs was determined in the Department of Agronomic Analysis of the Biotechnology Scientific Laboratory of the LLU. The

antibacterial efficiency of commercial EO, EOs produced by authors' and enriched commercial EOs we tested at LLU BZL MBMN.

**Research scheme and description of activities.** During the first research activity (2015-2018), we determined the prevalence of resistant and ESBL-producing *E. coli* in pigs. In total, we surveyed 7 pig farms, conducted their questionnaire and obtained 615 samples of pig **faeces**. Examined the samples bacteriologically – isolated the commensal indicator bacteria *E. coli* (n=615), and determined its sensitivity to 12 antibiotics; tested all faecal samples (n=615) for the presence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *E. coli*. We performed phenotypic confirmation for isolates with suspected ESBL-producing *E. coli* (n=144) and selected 50 ESBL *E. coli* isolates using a stratified random sampling method to detect the ESBL-encoding gene bla (TEM, SHV, CTX-M) presence by using molecular-biological methods. We determined the sensitivity to 18 antibiotics for the confirmed ESBL-producing *E. coli* (n=50).

During the second research activity (2015-2017), we purchased/prepared three feed components of natural origin (probiotics, probiotics+buckwheat bran and herbal supplement), which would show positive effects equivalent to use of antibiotics and would allow replacing antimicrobial agents in the feed ration for piglets; followed by feeding them to piglets from the 14th to the 56th day of life.

During the piglet feeding study, **blood samples** (n=50) were obtained, and their hematological and biochemical examination was performed. We examined faecal, rectal and digestive contents sample bacteriologically. In faecal samples (n=93) we determined the number of *E. coli* and *Enterobacteriaceae* in log  $kvv\ g^{-1}$ . From **rectal** samples (n=46) we isolated *E. coli* (n=80) and determined its resistance to 12 antibiotics. In turn, in the samples (n=28) of intestinal (*jejunum* and *colon*) content we determined the number of *E. coli*, *Enterobacteriaceae* and *Lactobacillus* spp. (log  $kvv\ g^{-1}$ ).

**Intestinal (*jejunum* and *colon*) tissue** (n=28) sections (n=280) were examined histologically (n=168) and immunohistochemically (n=112). We evaluated the histo-pathological state of the intestine, obtained histomorphological measurements of intestines-crypt depth (CD), villi height (VH), villi width (VW), VH:CD ratio, the number and density of goblet cells (GC), number and density of GC containing neutral and acidic mucopolysaccharide. We determined immunohistochemically the number and relative frequency of Ki67+ and CD3+ cells in various intestinal structures of small and large intestines. To determine the content of unsaturated and saturated fatty acids in muscle tissue, the content of fatty acids was determined using the gas chromatography method in **meat** samples (n=8).

During the third research activity (2018-2022), with the aim to promote the possibility to reduce the number of resistant *E. coli* in the environment of pig farms using plant-based agents, we carried out the development of active substance components for potential environmental treatment agents. Using the

hydrodistillation method, we obtained plant essential oils (EO) ( $n=3$ ) from medicinal plants grown in Latvia, as well we purchased commercially available analogs ( $n=3$ ). Next, we determined the chemical composition of EO ( $n=6$ ) using the gas chromatography method. We determined the antibacterial activity of all EOs comparing their effectiveness *in vitro* against ESBL-producing *E. coli* of difent levels of resistance isolated from pig faeces during the first research activity. We determined and compared the antibacterial activity of commercial and enriched (with caprylic acid, NaCl) commercial EOs, which would contribute to the practical use of these natural products for the reduction of resistant *E. coli*, including ESBL-producing *E. coli* in the pig industry.

## 1.2. Characteristics of the material

**Characteristics of pig farms.** During the first research activities period with the aim to find out about antibiotic resistance prevalence of *E. coli* in pigs in Latvia and to obtain faecal samples ( $n=615$ ), we surveyed seven pig farms with a closed production cycle. Four of them (L1, L2, L3 and L4;  $n=465$ ) were considered large (number of sows 700-2100) and three (S1, S2 and S3;  $n= 150$ ) as small (number of sows 15-40). In the form of questionnaire, we colected information about pig farms, the actuality of diarrhea in piglets, treatment and prevention.

**Characterization of feed components for piglets.** In order to evaluate the effect of different feed components of natural origin (probiotic-containing supplementary feed and animal feed components of plant origin) on the modulation of intestinal microbiota, the prevalence of resistant *E. coli*, the health of pigs and their intestines, during the second research activity (piglet feeding study) we used the following feed components:

- 4) *herbal supplement* – component of permitted plant origin feed (powdered substance prepared from the aerial parts of the medicinal plants collected in July 2015) – greater plantain (*Plantago major* L.), stinging nettle (*Urtica dioica* L.) and St. John's wort (*Hypericum perforation* L.), prepared in a ratio of 1:1:1 (further on in the text – *herbal supplement*).
- 5) *Buckwheat bran* – a plant-based feed ingredient made from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* L.). We bought buckwheat bran from the commercial producer Z/s "Bebri" (hereinafter referred to as buckwheat bran).
- 6) *probiotics*. As probiotics, we used the commercially available supplement containing probiotics "ProbioHelp" (1 ml contains: *Bacillus subtilis* ATCC PTA 6737 –  $7.42 \cdot 10^4$  cfu; *Bacillus subtilis* DSM 15544 –  $2.2 \cdot 10^6$  cfu; *Saccharomyces cerevisiae* NCYC Sc47 –  $7.0 \cdot 10^3$  cfu; *Lactobacillus casei* ATCC7469 –  $6.0 \cdot 10^3$  cfu; *Lactobacillus plantarum* CNCM I-3235 –  $2.0 \cdot 10^5$

cfu; *Lactococcus lactis* NCIMB 30117 –  $4.0 \cdot 10^5$  cfu; *Saccharomyces cerevisiae* IFO 0203 –  $7.0 \cdot 10^3$  cfu) (hereinafter referred to as probiotics).

**Characteristics of groups of piglets in the feeding study.** Piglet feeding research (the second research activity) was realized in one of the pig farms – L3, where the above-mentioned probiotics and permitted animal feed components of plant origin were fed to the piglets. We selected four litters for the study, where there were sows with 14-day-old crossbred piglets of the Landrace and Djurok breed (n=44), with an average live weight of  $4.96 \pm 0.13$  kg. The piglets of each litter were further divided into research groups – i.e. control group (C group, n=11), probiotics group (P group, n=11), probiotics and buckwheat bran group (PB group, n=11) and herbal group (group H, n=11). During the study, we added probiotics in a certain concentration to the drinking water of the P and PB group, while in the PB group additionally we added buckwheat bran in a certain concentration to the basic feed. For group H, we added the herbal supplement in a certain concentration to the basic feed. The research period was 6 weeks, ie from the 14th to the 56th day of piglets' life. The course of the feeding study is described in the part 1.3.2.

**Characterization of essential oils (EO).** To evaluate possibilities of reducing the resistant *E. coli* and ESBL-producing *E. coli* using herbal remedies – EO, during the third research activity we obtained plant EOs grown in Latvia and their analogues available on the commercial market.

We obtained EO from the aerial parts of medicinal plants grown in Latvia collected in July 2019: breckland thyme (*Thymus serpyllum* L.), common thyme (*Thymus vulgaris* L.) and mountain savory (*Satureja montana* L.) using the hydrodistillation method. We purchased three EOs: breckland thyme (*Thymus serpyllum* L.), producer "Primavera" (Germany), country of origin – Turkey; common thyme (*Thymus vulgaris* L.), producer "Oils4life" (United Kingdom) country of origin – Spain; mountain savory (*Satureja montana* L.), distributor "Hermitage Oils", country of origin – Croatia. According to the distributor, all commercial EOs are obtained by steam distillation.

### **1.3. Methodology description**

#### **1.3.1. Sampling of pig faeces in seven Latvian pig farms**

**During the first research activity,** from seven pig farms we obtained in a total 615 faecal samples from the following groups: piglets of 4 weeks old (n=110), 6 weeks (n=151), 8 weeks (n=105), 12 weeks (n=87), 20 weeks (n=85) and from sows (n=77) randomly selecting two to four samples from the pig pen, depending on the circumstances, ie immediately after defecation or by selecting the freshest possible faecal masses from the pen floor. We isolated *E. coli* from

the samples and determined the presence of ESBL-producing *E. coli*. Then determined the sensitivity of the isolated cultures to antibiotics. ESBL-producing *E. coli* were examined for the presence of ESBL-encoding genes. See chapter 1.3.3 for the methodology applied to the examination of the obtained samples (Bacteriological examination of samples) and 1.3.4. (Determination of ESBL genes using molecular biology techniques).

### 1.3.2. Piglet feeding study and sampling methodology

**During the second research activity**, at farm L3 we fed to piglets from the 14th to the 56th day of life probiotic-containing supplementary feed and plant-based feed components. Until the 28th day of the piglets' life (weaning), we kept the piglets of each research group together with the sow in the farrowing cage. After weaning, we moved the piglets to the weaned piglet room and the study continued in the same research groups until the piglets reached the age of 56 days.

**Piglets in group C** received basic feed and for the first two weeks after weaning, basic feed supplemented with 1000 mg ZnO kg<sup>-1</sup>. **Group P piglets** received basic feed and probiotics, which we added to the drinking water in a certain concentration (1%, 0.75%, 0.45%, 0.34%, 0.32%) according to the age of the piglets (14th, 28th, 35th, 42nd, 49th day of life). The piglets of the **PB group received** basic feed and buckwheat bran in the amount of 3% of its mass. Together with the drinking water, probiotics were given in a certain concentration (1%, 0.75%, 0.45%, 0.34%, 0.32%) according to the age of the piglets (14th, 28th, 35th, 42nd, 49th day of life). **Group H** piglets received basic feed with a herbal supplement in the amount of 1.5% of its mass. The recipe of the basic feed for piglets corresponded to the age and physiological needs of the piglets. Piglets received food and water *ad libitum*.

For feeding of piglets, we used mobile plastic feeders, and for dosing probiotics, we used the medicator "Lubing" (Lubing Maschinenfabrik, Germany).

**Blood samples** (n=50) were obtained from each animal on the first (14th day of piglet life) and the last (56th day of life) study day with a vacuum tube to which a needle was attached or with the help of a syringe from *v. jugularis externa/v. brachialis*. In blood samples hematologically we determined the total number of leukocytes, erythrocytes, granulocytes, lymphocytes, the hematocrit, hemoglobin, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin and mean corpuscular hemoglobin concentration using a veterinary hematological analyzer (Exigo Eos, Boule Medical AB, Sweden). In the serum we determined glucose, calcium, phosphorus, gamma-glutamyltransferase, alkaline phosphatase and

aspartate amino-transferase using a clinical chemistry analyzer (Mindray BS-200E, Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd., China).

We obtained **faecal samples** (n=93) of piglets on the 14th (n=13), 35th (n=37) and 56th (n=43) days of life immediately after their defecation, bacteriologically determined the number of *E. coli* and *Enterobacteriaceae* ( $\log \text{cfu g}^{-1}$ ). We obtained **rectal samples** (n=46) from the piglet's rectum with the help of a sterile cotton swab on the 14th (n=12) and 56th day (n=34) of the piglets' life, bacteriologically isolated *E. coli* and then determined its sensitivity to antibiotics. The investigations methodology, see in chapter 1.3.3.

At the end of the study (on the 56th day of piglets life), we randomly selected four piglets from each research group and two piglets from group C (n=14) and slaughtered them in a certified slaughterhouse. **Intestine content samples** were obtained from the small intestine (*intestinum tenuae*) jejunum (*jejunum*) part [20 cm proximal from the ileocecal fold of the peritoneum (*plica ileocaecalis*)] and from the large intestine (*intestinum crassum*) – the proximal part of descending colon (*colon descendens*). We determined the number of *E. coli*, *Enterobacteriaceae* and *Lactobacillus* spp. in the digestive contents ( $\log \text{cfu g}^{-1}$ ), bacteriological investigation methodology see in chapter 1.3.3. **Tissue samples for histological examination** (1.5-2 cm in size) were obtained from the *jejunum* [20 cm proximal from the ileocecal fold of the peritoneum (*plica ileocaecalis*)] and from the large intestine (*intestinum crassum*) – the proximal part of descending colon (*colon descendens*). We fixed the obtained tissue samples in 10% neutral buffered formalin solution, histological and immunohistochemical investigation methodology, see in chapters 1.3.5. and 1.3.6.

**Muscle samples** (n=8) obtained from the lumbar and pectoral part of the longissimus muscle (*m. Longissimus thoracis et lumborum*) and we determined the content of unsaturated and saturated fatty acids using the gas chromatography method, according to the instruction BIOR-T012-131-2011.

### 1.3.3. Bacteriological examination of samples

We performed bacteriological examination of pig faecal samples (n=615) (first activity) and piglet rectal (n=46), faecal (n=93) and digestive contents (n=28) samples (second activity).

Isolation of *E. coli* and detection of ESBL-producing *E. coli* in faecal samples. To isolate *E. coli* from faecal (n=615) and rectal (n=46) samples, we used Levin's eosin methylene blue agar (Levine EMB Blue Agar, Biolife), but to detect the presence of ESBL-producing *E. coli* in faecal (n=615) and piglet rectal (n=46) samples – we used a selective differential medium – Chromogenic ESBL Agar (Chromart ESBL Agar, Biolife). For confirmation of the suspected *E. coli*

isolates we performed biochemical tests – oxidase (Oxidase Reagent Droppers, BD), urease [Urea Agar (Christensen), Biolife], citrate (Simmons Citrate agar, Oxoid) and indole (Tryptophan Peptone Water, Sifin; Kovacs` reagent, Biolife).

Phenotypic confirmatory test for ESBL production. According to EUCAST recommendations (EUCAST, 2017b) for confirmation of suspected ESBL-producing *E. coli* (n=144), we used the combination disk test and performed it according to CLSI guidelines (CLSI, 2018b).

*E. coli* and ESBL *E. coli* susceptibility to antibiotics determination. For *E. coli* isolated both during the first and second activity we determined sensitivity to 12 antibacterial agents [ampicillin, amoxicillin+clavulanic acid, cefazolin, cefotaxime, imipenem, sulfameoxazole+trimethoprim, trimethoprim, gentamicin, chloramphenicol, tetracycline, enrofloxacin, ciprofloxacin (BD BBL Sensi-Disc, USA)] according to the disc diffusion method (EUCAST, 2017a). ESBL-producing *E. coli* (n=50) besides the already mentioned 12 antibiotics, we additionally determined the sensitivity to six more (mecillin, ticarcillin, cephalixin, cefoxitin, cefixime and cefepime) antibiotics.

Multidrug-resistant *E. coli* detection. All *E. coli* isolates for which we determined sensitivity to antibiotics were evaluated for compliance with the status of multidrug-resistant bacteria (Magiorakos et al., 2012), but we classified them into different levels of multi-resistance according to Jahanbakhsh's instructions (Jahanbakhsh et al., 2016).

ESBL-producing *E. coli* by MALDI-TOF technology. Phenotypically confirmed ESBL-producing *E. coli* isolates (n=50), we identified/reconfirmed using the VITEK MS (bioMerieux SA, France) identification system, which is based on MALDI-TOF technology.

Determination of the number of Enterobacteriaceae, *E. coli* and *Lactobacillus* spp. We determined the number of *Enterobacteriaceae*, *E. coli* and *Lactobacillus* spp. in the samples of piglets' digestive content (n=28), while in piglet faecal samples (n=93) we determined the number of *Enterobacteriaceae* and *E. coli*. The initial suspension and serial decimal solutions we prepared in accordance with the requirements of the LVS EN ISO 6887-1:1999 standard. The isolation and enumeration of bacteria of ***Enterobacteriaceae* family** we performed in accordance with the requirements of the LVS EN ISO 21528-2:2007 standard. Isolation and enumeration of ***E. coli*** we performed in accordance with the requirements of the LVS EN ISO 16649-2:2007 standard. For the isolatation and enumeration of ***Lactobacillus* spp.**, we used MRS agar with the polysorbate 80 additive (MRS agar with Tween® 80, Biolife) and the investigation was performed according to the manufacturer's recommendations. To calculate the number of *Enterobacteriaceae*, *E. coli* and *Lactobacillus* spp. per gram of a sample, we used the recommendations of the LVS EN ISO 8199:2019 standard. We expressed the results as  $\log_{10}$  cfu g<sup>-1</sup>.

### **1.3.4. Detection of ESBL genes using molecular biology techniques**

For the identification of the presence of ESBL genes *bla* (*bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla* <sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>) in ESBL-producing *E. coli*, we used polymerase chain reaction (PCR).

First, the DNA isolation was performed from an 18±2 h old phenotypically confirmed of ESBL-producing *E. coli* pure culture, using the EZNA Bacterial DNA Isolation Kit (Omega Bio-tek, USA) following the manufacturer's protocol. The amount of obtained DNA was monitored using an ND-1000 spectrophotometer. The PCR reaction was performed using HotStarTaq®Plus Masters Mix kit (QIAGEN, Germany) according to the manufacturer's instructions and using the following ESBL gene primers (J. Kim et al., 2009):

- 4) TEM – F: (5'-AGTGCTGCCATAACCATGAGTG-3') and TEM R: (5'-CTGACTCCCCGTCGTAGATA-3');
- 5) SHV – F: (5'-GATGAACGCTTCCCATGATG-3') and SHV R: (5'-CGCTGTTATCGCTCATGGTAA-3');
- 6) CTX M Group 1 – F: (5'-TCCAGAATAAGGAATCCCATGG-3') and CTX M Group 1 R: (5'-TGCTTACCCAGCGTCAGAT-3').

A thermal cycler ABI2770 (Applied Biosystems, USA) was used to perform the DNA amplification reaction. At the conclusion of the PCR reaction, the amplified DNA was separated using electrophoresis in a 2% agarose gel. The positions of the DNA fragments in the gel were determined by viewing the electrophoresis gel in a transilluminator under ultraviolet light. A 50 bp marker (GeneRuler 50 bp DNA Ladder, Thermo Scientific, SM0371) was used as marker for DNS size. TEM-positive isolates were 431 bp long, SHV–214 bp long, and CTX M – 621 bp long.

### **1.3.5. Histological examination**

Preparation of samples for histological examination. Fixed intestine (*jejunum* and *colon*) tissue samples were sectioned and placed in tissue cassettes (Bio-Optica, Italy) for processing in a tissue processor LEICA ASP200S (Leica, Germany). After they were embedded in paraffin blocks (n=28) using the Embedding System TES 99 (MEDITE, Germany). Using a microtome, 4 µm thick sections (n=168) were prepared and stained by the Hematoxylin-Eosin method (H&E), (Carson, 1997), Periodic Acid-Schiff methods (PAS) (Kiernan J.A., 2008) and Alcian blue pH 2.5 methods (AB) (Bio-Optica protocol).

Microscopic examination of histological sections. In the H&E histological sections of the *jejunum* and *colon* (n=56), the general morphological

and **histopathological condition** was observed using a light microscope (Zeiss, Germany). Two tissue sections for each sample were analyzed, at a magnification of 100-1000, determining the severity of inflammation (in points from 0 to 4), the spread of inflammation (diffuse, local, multifocal), the amount of inflammatory cells, erythrocytes (from 0 to 4) and the presence of microorganisms.

To obtain **micromorphometric measurements** of the small (*jejunum*) and large (*colon*) intestines, we analyzed H&E stained sections (n=56) using a light microscope (Leica, DM3000LED, Germany), a camera (Leica DFC450, Germany) and histological image processing and analysis program (Leica Application Suite, version 4.10.0). We obtained the following measurements – intestinal villi (*villi intestinales*) height (VH), width (VW) and crypts (*cryptae intestinales*) depth (CD), number and density of goblet cells (*enterocyti calciformes*, GC). We microscoped the sections at 100-400 × magnification, in three repetitions, measuring 10 well-oriented structures of intestinal villi and crypts. We measured VH from the apex of the intestinal villi to the base of the villi. VW was measured in the middle part of the intestinal villi, and CD – from the lowest point of the crypt invagination to the base of the villi. We counted the total number of GCs in the villi and crypts of the small and large intestines and expressed it as n/in crypt, n/villi and density – as the number of GCs in relation to the height of the villi or the depth of the crypts (μm).

The differentiation and counting of the neutral (PAS+) and acidic mucopolysaccharide-containing (AB+) goblet cells (GC) was performed by analyzing stained tissue sections (n=112) by PAS and AB methods. PAS+GC stained purple, but AB+GC stained light blue. From each sample, in three replicates we selected ten well-oriented intestinal villi and crypt structures. We determined the number of PAS+GC and AB+GC in villi and crypts; expressed their density as the number of PAS+GC and AB+GC in relation to the height of the villi and the depth of the crypts (μm).

### 1.3.6. Immunohistochemical examination

We stained piglet intestinal tissue sections with immunohistochemistry (IHC) methods and determined the nuclear protein Ki67 to visualize intestinal epithelial cells in the active phases of their life cycle, but the surface protein CD3 – to identify T lymphocytes in piglet intestines. To label immunoreactive (Ki67, CD3) cells was used the Dako EnVision®+System HPR reagent kit and reactions were performed according to the manufacturer's protocol. Taking into account the parameter to be determined – Ki67+ and CD3+ cells, during the execution of the reaction were changed accordingly the primary ones – Ki67 nuclear protein (Dako, clone MIB-1, IR621) and CD3 surface antibodies (Dako,

A0452). Although both of the above-mentioned antibodies have been produced for the visualization of human cellular proteins, the authors' reports (Wiarda et al., 2020; Wiyaporn et al., 2013) demonstrate the ability of these antibodies to label the relevant cellular proteins in pigs.

For internal quality control of IHC reactions, positive and negative control samples were prepared using histological sections of human tonsils from the archives of the Pathology Center of Riga Eastern Clinical University Hospital. In the positive control samples, the immunoreactive CD3 cells mainly are localized in the extra-follicular zone of the tonsils and the CD3+ cell membranes are characterized by brown staining. In turn, the immunoreactive Ki67 cells mainly are localized in the germinal centers of the tonsils, where their proportion was 80-90% of the number of cells, characteristic brown staining of Ki67+ cell nuclei. Negative control samples were prepared from the above mentioned tissues, but the primary antibody (CD3/Ki67) was replaced with the antibody solvent (Antibody Diluent, Dako, S3022). No brown staining of CD3+ and Ki67+ cell structures was detected in the negative control samples.

Microscopic analysis of IHC sections. The analysis of piglet intestinal tissue sections stained with the IHC method we performed using 100-400× magnification. The number of proliferating epithelial cells (Ki67+) we determined in ten well-oriented crypt structures of small and large intestines and expressed as the number of positive cells n/100 µm. The number of intraepithelial T lymphocytes (IEL CD3+) we determined in ten well-oriented villi and crypt structures of small and large intestines and expressed as the number of positive cells n/100 µm. The relative frequency of CD3+ cells we analyzed in *jejunum* and *colon lamina propria* (both in the intestinal villi and crypts), Peyer's patches (interfollicular, dome + follicular area) and colon submucosa. Each sample we analyzed in ten randomly selected fields of view for each structure. For CD3+ cells we visualized a brown cell membrane, and for Ki67+ cells – a brown colored nucleus. The relative frequency of CD3+ cells we determined according to the semi-quantitative counting method (Pilmane et al., 1998).

### **1.3.7. Determination of the chemical content of plant essential oils (EO)**

The chemical composition of our own extracted and commercial essential oils (EO, n=6) we determined using the gas chromatography method and using a gas chromatograph (Perkin Elmer, Clarus 580), equipped with a mass-selective detector (Clarus SQ 8 C). Compounds were separated using a polyethylene glycol stationary phase Omegawax 250 capillary column (30 m × 0.25 mm, 0.25 µm sorbent layer thickness). The control of the equipment was provided by "TurboMass Ver6.0.0" software, while data processing was realized with "NIST

MS 2.2 Library" (FairCom Corp., USA) computer program. EO components were identified according to their release indices (Iwanami et al., 1997; Keita et al., 2000; Njoroge et al., 1996; Tabanca et al., 2006) and compared with reference spectrum in databases (Wiley/NIST). For all EO components, the release index was experimentally determined based on the release times of n-alkanes under programmed temperature conditions using the two-function calculation equation (Mjøs, 2004).

### **1.3.8. Testing the antibacterial efficacy of plant essential oils (EOs) and enriched EOs**

To determine the antibacterial activity of EOs, we used ten *E. coli* / ESBL-producing *E. coli* isolated from pig faeces and *E. coli* reference strain ATCC 25922 for control (Bioscience, United Kingdom).

The antibacterial activity of EOs was determined using the broth micro-dilution method (CLSI, 2018a), by detecting the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) as described previously (Mandrika et al., 2021). MIC is the minimum concentration of EO that visibly inhibits the growth of bacteria, MBC – the minimum concentration of EO required to kill bacteria – in the bacterial concentration of the initial inoculum reduced by 99.5% and 95%. We calculated the percentage of inhibited bacteria according to a previously reported equation (Cheng et al., 2015).

**For determination of MIC** we used 20±2 h old *E. coli* standard culture with a density of 0.5 McF. Next, we made its dilutions to reach  $1.5 \cdot 10^6$  cfu mL<sup>-1</sup>. We diluted the EO with DMSO (Dimethyl sulfoxide, Sigma-Aldrich, D2650) to a concentration of 500 µL mL<sup>-1</sup>. Next, we introduced 100 µL of Muller-Hinton broth into each well of a 96-well plate (Muller-Hinton Broth, OXOID). Into the first well of the plate we brought the prepared solution of 100 µL of the EO to be tested and made serial dilutions. In parallel, we performed control of the antibacterial efficiency of DMSO and gentamicin 0.5 mg mL<sup>-1</sup> – by performing serial dilutions in the same way as for the EO solution. In all the test wells, we added 50 µL of bacterial inoculum and another 50 µL of physiological solution (0.9% w/v) (in the test for the antimicrobial activity of the enriched EOs, the physiological solution part was replaced by hypertonic NaCl or caprylic acid solution, respectively) resulting in a bacterial suspension in each well of the plate with a concentration of  $5 \cdot 10^5$  cfu mL<sup>-1</sup>. The concentration of EO in the wells after serial dilution was from 125 µL to 0.000238 µL mL<sup>-1</sup>. For the negative control, the well of the plate contained only 200 µL of Miller-Hinton broth, and for the positive control, the well contained 100 µL of Miller-Hinton and 100 µL of bacterial suspension. From the positive control, 1 µL we inoculated in Muller-

Hinton agar (Muller Hinton agar II, Biolife) to determine the real concentration of cfu in the well and for use of MBC determination. Microplates we incubated at  $36\pm1$  °C,  $20\pm2$  h. After incubation, we read the MIC, which was the last clear well before the well where no turbidity of the medium was observed. **To determine MBC**, 1 µL of each clear well was plated onto Miller-Hinton agar. We incubated at  $36\pm1$  °C,  $20\pm2$  h and counted cfu. The lowest EO concentration that provided 95% and 99.5% bacterial killing was designated as MBC 95% and MBC 99.5%. We repeated the antibacterial efficacy test of each EO in two replicates.

In order to determine the **MIC and MBC values of the enriched EO** (with 3% NaCl or 1 mM caprylic acid), we initially prepared the following stock solutions – 12% NaCl-deionized water solution (w/v) and 4 mM caprylic acid solution (we dissolved the necessary amount of caprylic acid in a 20% alcohol-distilled water solution). We determined the antibacterial efficiency of the EO enriched with NaCl and caprylic acid according to the methodology described above, but during the execution of the test, before introducing the bacteria-containing inoculum into each of the test wells, we replaced the part of physiological solution (50 µL) with 50 µL of 12% NaCl solution or respectively with 50 µL of 4 mM alcohol-water solution of caprylic acid. As a result each test well contained respectively either 3% NaCl additive or 1.0 mM, caprylic acid additive. In parallel, we controlled the effect of 3% NaCl and 1.0 mM the effect of caprylic alcohol-water solution on the inhibition of bacterial growth or their bactericidal effect. Next, we determined the enriched EO MBC 99.5% and MBC 95% as described above.

### 1.3.9. Statistical analysis of data

For all quantitative measurements, we calculated indicators such as arithmetic mean ( $\bar{x}$ ), standard deviation (SD) and standard error of the mean (SE).

For the characterisation of the differences in the prevalence of resistant to various antibiotics *E. coli* and the occurrence of ESBL-producing *E. coli* between large and small pig farming farms, between groups of pigs of different ages, we used the  $\chi^2$  test (*Chi-Square test*) and pairwise comparison as a *post-hoc* test. To compare the prevalence of antibiotic resistance, as well as the distribution of ESBL-encoding genes in ESBL-producing *E. coli* in groups of large and small pig farms, we used Fisher's test. We determined the associations between  $\beta$ -lactamase genes and antimicrobial resistance using the odds ratio (*odds ratio*) and 95% confidence intervals.

We used the one-way analysis of variance (one-way ANOVA) to determine the influence of the factor (type of food component) on the investigated characteristics – blood biochemistry and hematology indicators,

changes in the bacterial population, histomorphological changes in the small and large intestine and changes in the composition of fatty acids in muscle tissue. Upon finding a significant effect of a factor, Duncan's multiple range test was performed to determine between which classes of the factor gradation there were significant differences. In order to evaluate the differences in the distribution significance of the relative frequency (semiquantitative data) of CD3+ cells, between the study groups we performed the non-parametric *Kruskal-Wallis* test, which is intended for the comparison of several independent groups by one characteristic. Rejecting the null hypothesis, we used the Conover-Iman multiple pair comparison test as a *post-hoc* test.

We used the two-way analysis of variance (two-way ANOVA) to determine the factor EO-origin (commercial/Latvian) and EO type (*T. serpyllum*, *T. vulgaris* and *S. montana*) influence on the studied characteristic-antibacterial activity (MIC/MBC). Similarly, two-way analysis of variance was used to determine the influence of factors (type of commercial EO) and enrichment additive (caprylic acid, NaCl) on the investigated characteristic-antibacterial activity (MIC/MBC). Rejecting the null hypothesis, we used the Bonferroni test as a *post-hoc* test to determine the level of significance between groups. We used the paired sample t-test to compare the mean values of the obtained characteristics (MIC/MBC) for each type of EO, while the unpaired t-test was used to compare the mean MIC values of each commercial EO (with/without additive) against ESBL-producing and ESBL-non-producing as well as MDR and non-MDR *E. coli*.

We considered the results to be statistically significant if the p-value was less than 0.05, and the trend towards significance if the p-value was in the interval from 0.05-0.10. We used the computer program Microsoft Excel 2016 (16.0.4266.1001) for data input and visual display of the research results. Statistical data processing was performed with the R Studio software (version 1.1.463).

## 2. RESEARCH RESULTS AND DISCUSSION

### 2.1. Prevalence of resistant and ESBL-producing *E. coli* in pig farms

*Escherichia coli* (*E. coli*) is a commensal bacterium in the digestive tract of humans, animals, incl. pigs, but some *E. coli* strains are pathogenic and can cause various diseases, e.g. colibacteriosis, which is especially relevant in suckling and weaned piglets (Gyles & Fairbrother, 2010). In addition, *E. coli* belongs to bacteria of the family *Enterobacteriaceae*, which has the ability to

acquire and exchange resistance genes during conjugation, or so called horizontal gene transfer, making *E. coli* a reservoir of resistant genes (C. Tan etc et al., 2012). It is essential that the resistant ones *E. coli* are able to spread not only between animals in the population, but also to humans, moreover, resistant genes can be transferred to other pathogenic bacterial species during conjugation (EFSA & ECDC, 2020). Therefore it is important from the point of view of public and animal health to determine the commensal *E. coli* resistance in the pig population, paying special attention to pigs of different ages, farm size as influencing factors of antimicrobial resistance.

According to the information provided by the owners/veterinarians of pig farms, penicillins, broad-spectrum penicillins were widely used in the treatment of pigs in most farms, but the use of cephalosporins in the treatment of pigs was indicated by two farms (L1 and L3). From other than  $\beta$ -lactam antibiotics, most often in the treatment of pigs were used – oxytetracycline, trimethoprim-sulfadiazine and fluoroquinolone (Table 2.1). However, it must be admitted that questions about antibiotic use habits in the treatment of pigs are answered evasively and incompletely. In a large-scale study, Lekagul and his co-authors realised that to obtain detailed information about the use of antibiotics in pig farms, methods other than questionnaires are needed, for example antibiotic use reviews (Lekagul etc et al., 2019).

According to SPKC "One Health" report (SPKC, 2019) during the period of 2015-2019 the most sold groups of antibiotics for productive animals in Latvia were tetracyclines (29.4-28.2%), broad-spectrum penicillins (20.1-14.9%), macrolides, lincosamides (10.6-14.5%), aminoglycosides (8.8-15.6%), sulfonamides and trimethoprim (5.9-5.3%), fluoroquinolones (2.9-3.1%). In Europe, according to the 10th ESVAC report (European Medicines Agency, 2021), where data about 31 European countries are collected, the most sold antibiotic classes were tetracyclines (30.7%), penicillins (28.8%), macrolides and lincosamides (12.1%), sulfonamides and trimethoprim (10.1%), aminoglycosides (6.2%) and fluoroquinolones (2.5%).

Based on the results of our research in pig farms there is the commensal *E. coli* has a very high level of resistance to tetracycline 54.63% (n=336); high – against ampicillin 32.03% (n=197), trimethoprim 24.07% (n=148), sulfamethoxazole-trimethoprim 22.44% (n=138), amoxicillin-clavulanic acid 22.28% (n=137); moderately high – against chloramphenicol 12.68% (n=78); low – against fluoroquinolones (enrofloxacin – 8.78%, ciprofloxacin – 3.58%), gentamicin (5.69%), cefazolin (4.55%) and third generation cephalosporins (cefotaxime) – 1.46%. No resistance of *E. coli* to imipenem, an antibiotic of the carbapenem group, was observed.

If we compare the resistance of isolated *E. coli* in the pig population and the most frequently used antibiotics in pig farms, as well as the most frequently sold antimicrobial substances in Latvia and Europe, we can see the relationship

that the highest resistance of isolated *E. coli* is observed against antibiotics that are more often used in the treatment of pigs, namely tetracyclines, broad-spectrum penicillins and combinations of trimethoprim with sulfonamides. Similar to the results of our study, the annual antimicrobial resistance report of the European Union (EFSA & ECDC, 2020) and most researchers in the world have emphasized the high resistance of *E. coli* isolated from pigs to the tetracycline, ampicillin and trimethoprim, sulfamethoxazole (Burow etc et al., 2019; Hayer etc et al., 2020; Ström etc et al., 2017).

National surveillance programs for antimicrobial resistance focus on animals of a certain age group, but the prevalence of resistance varies significantly between different pig production and age groups (Burow et al., 2019).

In our study, *E. coli* isolated from **four-week-old piglets** showed high resistance to tetracycline (66.4%), trimethoprim and its combination with sulfamethoxazole (37.3% and 40.0%, respectively), ampicillin (38.2%), chloramphenicol (25.5%), gentamicin (10.9%), fluoroquinolones (7.2%) (Table 2.2). The microbiota of newborn piglets is largely influenced by the vertical transfer of bacteria from the sow (vagina, milk) and the environment (floor, drinking nipple surface); however, during lactation, the intestinal microbiota of piglets is easily colonized by the sow's fecal microbiota until the piglets imitated it at the end of suckling period (Chen et al., 2018). Treatment of sows with antibiotics in the postpartum period significantly increases the spread in piglets the resistant *E. coli*, and not only against antibiotics used in treatment (Callens et al., 2015).

**In weaned piglets**, we found a significant decrease of resistant *E. coli* to enrofloxacin (0.7%), gentamicin (2.7%), chloramphenicol (2.7%), but remained consistently high against tetracycline (58.3%), trimethoprim (21.2%), while resistance to ampicillin (42.53%) and amoxicillin-clavulanic acid (32.18%) showed an increasing trend. In three of the seven pig farms included in our study, the occurrence of diarrhea was characterized as frequent, in two-as sporadic; more often in the post-weaning period. Current studies emphasize that antibiotics are most often used in piglets in the post-weaning period (69.5%), while in the lactation period – 22.5% of cases. In the post-weaning period, mainly (82%) group treatment of animals is used (metaphylaxis), the most frequently mentioned active substances are extended-spectrum penicillins (31.2%) and polymyxins (24.7%) (Sarrazin etc et al., 2019). Usually, treatment of pigs *per os* is associated with an increased risk of developing resistance (Varga etc al., 2009), but there are authors who emphasize that any antibiotic therapy carries risks (Burow etc et al., 2019).

**In fattening pigs**, we observed a significant decrease of resistant *E. coli* to most of the tested antibiotics – tetracycline (30.6%), ampicillin (14.1%), trimethoprim and its combination with sulfamethoxazole (3.5% and 1.2%,

respectively), but resistance to gentamicin and enrofloxacin was not detected. The prevalence of resistant *E. coli* decreases during the fattening period of pigs (Akwar et al., 2008; Burow et al., 2019), due to a significant reduction in the frequency of treatment (8%) (Sarrazin et al., 2019), and antibiotic residues in pork must be avoided (Akwar et al., 2008).

**To compare the prevalence of resistant *E. coli* in large and small pig farms, the results show that** it is higher ( $p<0.01$ ) in the group of large farms against eight out of 12 antibiotics (ampicillin, amoxicillin-clavulanic acid, sulfamethoxazole-trimethoprim, trimethoprim, gentamicin, tetracycline, chloramphenicol and enfofloxacin); on the other hand, we did not observe significantly higher resistance to any of the antibiotics in the small farms. *E.coli* resistance to ciprofloxacin, cefotaxime and cefazolin did not differ significantly between large and small farm groups and was rated as very low (Table 2.3).

Our results are consistent with other reports (Burow & Käsbohrer, 2017; Ström et al., 2017) that pig herd size has a positive association with higher distribution of the resistant *E. coli*, but other authors emphasize the multifactorial influence on resistance-promoting conditions (Dewulf et al., 2007; Dohmen et al., 2017).

**The emergence of multidrug-resistant (MDR) bacteria** poses a significant threat not only to animal health, but to the entire society (Aarestrup, 2005; Tanwar et al., 2014). If we compare prevalence of the **MDR *E. coli* in large and small pig farms**, we found a significantly higher prevalence in large (42.4%) than in small (2%) farms (Table 2.4). Moreover, we observed that in large farms 27.92% ( $n=55$ ) of isolated MDR *E. coli* were resistant to five or more antibiotic classes. If we compare the prevalence of **MDR *E. coli* among pig groups of different ages**, a high prevalence (36.42-47.27%) of MDR *E. coli* was observed in 4- to 12-week-old piglets and gilts, the lowest in fattening pigs (11.76%), and in sows – 14.29% (Table 2.5). It should be emphasized that 63.64% of MDR *E. coli* isolated from sows showed resistance to five or more classes of antibiotics, while in fattening pigs we did not detect so extensive MDR *E. coli* phenotypes; but in 4, 8 and 12-week-old piglet groups, the proportion of MDR *E. coli* reached 30.77 to 35.90%.

As one of the reasons for higher MDR *E. coli* prevalence in larger herds is the use of more diverse antimicrobial agents for the treatment of pigs (Ström et al., 2017), what was found also in our study. Moreover, the selection of MDR bacteria, including *E. coli*, is facilitated by the use of antimicrobial agents in combinations (Varga etc et al., 2009). Interestingly, in a study in Thailand, the higher (95.7%) prevalence of MDR *E. coli* was observed in medium-sized farms (500-5000 pigs) than in large farms (>5000 pigs) – 87.7%, which was explained by more effective biosecurity management and more regular veterinary visits to the farm (Dawangpa et al., 2022). Comparing the prevalence of MDR *E. coli* among different age groups of pigs, one can see the general trends – the

prevalence of resistant MRD *E. coli* decreases during the pig production cycle, i.e. during the fattening period of pigs. Moreover, such MDR *E. coli* are characterized by narrower phenotype; but frequent and use of different antimicrobial agents *per os* during the weaning period results in higher MDR *E. coli* distribution in piglets (Varga etc et al., 2009).

In total, in seven pig farms included in the study, we found 89 different phenotypes of the resistant *E. coli*. The most frequently detected phenotype TE (19%) was resistant to only one antibiotic, i.e. tetracycline, but at the same time – 37% of all phenotypes contained resistance to fluoroquinolones. The most frequently observed MDR *E. coli* phenotypes were AM-AMC-TE (6.5%, n=40) and AM-SXT-TMP-TE (4.9%, n=30). One of the isolated *E. coli* phenotypes AM-CZ-GM-AMC-SXT-TMP-C-TE-ENO showed resistance to even 9 out of 12 antibiotics. Both our results and the studies of other authors reveal a very large diversity of the phenotypes of the resistant *E. coli* in the pig population (Akwar et al., 2008; Jahanbakhsh et al., 2016), but in most cases the dominant is resistance to such antibiotics as  $\beta$ -lactams-trimethoprim-sulfonamides-tetracycline.

**ESBL-producing *E. coli* in a pig population.** The intensive and misuse of antibiotics, especially  $\beta$ -lactams in human and veterinary medicine has contributed to the selection and spread of ESBL-producing bacteria. The World Health Organization has indicated that the third-generation cephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae*, incl. *E. coli*, is one of the world's most serious and critical problems of the 21st century (WHO, 2017). According to our results, using the selective differential method and examining 615 pig faecal samples from seven pig farms, the presence of ESBL-producing *E. coli* we found in four (L1, L2, L3 and S1) pig farms, in a total of 144 samples (23.4%).

Among the large pig farms, the highest occurrence of ESBL-producing *E. coli* was observed in farm L1 (64.3%), while among small farms – in the farm S1 (47.5%). Although ESBL-producing *E. coli* occurs more often ( $p=0.029$ ) in large (26.9%) than small pig farms (12.7%), it should be emphasized that the frequency of ESBL-producing *E. coli* differs significantly between farms, both in the large and small farms groups (Table 2.6).

When evaluating the prevalence of ESBL-producing *E. coli* in pigs of different ages and physiological conditions, we observed a significantly higher prevalence in four- and six-week-old piglets (28.3% and 35.1%) and sows (41.6%), while it was lower in 20-week-old fattening pigs (8.2%) (Table 2.7).

Our results reveal that farm size could be one of the risk factors for a higher incidence of ESBL-producing *E. coli* in pig faeces, but this statement should be taken with caution because in our study the two farms with the highest incidence of ESBL-producing *E. coli* were observed in both the large (L1), and in the group of small farms (S1). So far, authors have highlighted numerous factors (e.g. deficiencies in biosecurity measures, excessive use of antibiotics,

especially cephalosporins and fluoroquinolones) that contribute to the occurrence of ESBL-producing *E. coli* in pig farms (Dohmen et al., 2017; Gay et al., 2018). We also observed a causal relationship between the increased incidence of diarrhea in piglets, the wider use of antibiotics and the subsequent higher incidence of ESBL-producing *E. coli* in pig farms. In all pig farms (L1, L2, L3 and S1) where we detected the presence of ESBL-producing *E. coli*, the incidence of diarrhea in piglets was assessed as 'frequent' (L1, L2 and S1) or 'sporadic' (L3) and treatment was done by using amoxicillin (L1, L2, S1), fluoroquinolones (L1, L3, S1) and/or cephalosporins (L1, L3). Amoxicillin is available *per os* for use in pigs, but it has low absorption and bioavailability (Reyns et al., 2009), thus creating a large selective pressure on the intestinal microbiota, which contributes to the selection of resistance (Burch & Sperling, 2018). Presumably, the use of amoxicillin *per os* could be one of the most important factors for the prevalence of ESBL-producing *E. coli* in piglets during the weaning period. The role of fluoroquinolones in the spread of ESBL-producing *E. coli* has been reported previously (Basu & Mukherjee, 2018) and could have contributed to the occurrence of ESBL-producing *E. coli* in L1, L3 and S1 farms. On the other hand, diarrhea was rarely observed in piglets of farms S2 and S3, non- $\beta$ -lactam antibacterial agents were chosen for treatment, which explains the absence of ESBL-producing *E. coli* in the faeces of pigs from these farms.

We observed that all isolated ESBL-producing *E. coli* were resistant to ampicillin, ticarcillin and cefazolin; but isolates from large pig farms were resistant (100%) to cephalexin, cefotaxime, cefepime and we also often found resistance to amoxicillin-clavulanic acid (87%), trimethoprim (84%), sulfamethoxazole-trimethoprim (84%), tetracycline (79%) and gentamicin (53%). While the isolates from small farms often were resistant to ceftazidime (83%), cefotaxime (83%), cefixime (83%), chloramphenicol (75%) and cefepime (50%). We did not observe resistance to mecillin and imipenem in ESBL-producing *E. coli* (Figure 2.1).

In our study, 96% (n=48) of the isolated ESBL-producing *E. coli* were classified as MDR, and those isolated from weaned piglets (47.6%) and sows (37.5%) often showed resistance to eight or more antibiotic classes. Such level of resistant ESBL-producing *E. coli* was significantly less frequently observed in fattening pigs (14.2%) (Figure 2.2). More extensive MDR ESBL-producing *E. coli* phenotypes have been reported in weanling and weaned piglets compared to fattening pigs in other studies as well (Akwar et al., 2008; De Lucia et al., 2021). General factors contributing to the development of resistance, such as excessive/incorrect use of antimicrobials, [in piglets in the form of metaphylaxis – not only for treatment, but also for prevention, especially because young animals have an increased risk of intestinal infections and are more often exposed to various stressful situations (weaning of piglets, pooling of litters, feed and

environmental change) (Akwar et al., 2008)] could also contribute to the spread of MDR ESBL-producing *E. coli*. On the other hand, sows, although more often, receive antibacterial agents individually (parenterally), which could be a positive factor in limiting the spread of resistance (Jensen et al., 2012), but since different types (active ingredients) of antimicrobial agents are chosen for the treatment of sows during their lifetime (Lekagul et al., 2020), could contribute to the formation of more extensive MDR ESBL-producing *E. coli* phenotypes, as well as their higher prevalence.

All ESBL-producing *E. coli* from large pig farms were classified as MDR, and most of them had broad MDR phenotypes, ie 79% were resistant to six or more classes of antibiotics. In contrast, none of the ESBL-producing *E. coli* isolated from the small pig farm showed resistance to six or more antibiotic classes, and 16.7% were not classified as MDR (Figure 2.2).

Our results confirm the observations of other authors that MDR ESBL-producing *E. coli* are more often isolated from large than small pig farms (Ström et al., 2017). In our study, not only metaphylaxis (Varga et al., 2009), but also the use of zinc oxide as a feed additive could contributed to the higher prevalence of MDR ESBLs producing *E. coli* in large pig farms. All surveyed large pig farms (L1, L2, L3 and L4) used zinc oxide as a feed additive for piglets in the post-weaning period, so this could have been a noteworthy factor in the prevalence of more extensive MDR phenotypes in the large pig farms. There are several reports that the inclusion of high-dose zinc oxide in pig diets can contribute to the selection of antimicrobial resistance and MDR phenotypes in the pig intestine (Ciesinski et al., 2018; Hölzel et al., 2012).

**ESBL-producing *E. coli* and their encoding ESBL genes.** In all phenotypically confirmed ESBL-producing *E. coli*, we detected at least one ESBL-encoding gene which confirms that our isolated *E. coli* are capable of producing ESBL enzymes. The most frequently detected ESBL-encoding gene was *bla<sub>TEM</sub>* (94%; n=47), followed by *bla<sub>CTX-M</sub>* (86%, n=43) and *bla<sub>SHV</sub>* (48%, n=24). In most cases (90%; n=45), we observed ESBL coding genes in combinations of two or more genes. The most common ESBL gene combination was *bla<sub>TEM</sub>* and *bla<sub>CTX-M</sub>* (42%; n=21), followed by all three genes (*bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>* and *bla<sub>CTX-M</sub>*) coexistence (36%; n=19), but less frequently *bla<sub>TEM</sub>* and *bla<sub>SHV</sub>* (10%; n=5) gene combination. Similar to what we observed in our study, several European scientists have also found high *bla<sub>CTX-M</sub>* and *bla<sub>TEM</sub>* distribution in the pig population, and most often these ESBL-encoding genes have been found to be in combination (Barilli et al., 2019; Biasino et al., 2018; Von Salviati et al., 2014).

In the small farm (S1), we found the presence of the ESBL-coding gene *bla<sub>SHV</sub>*, together with other *bla*-coding genes significantly more often than in the large farms (83.3% vs. 36.8%, p=0.007), while the presence of the *bla<sub>CTX-M</sub>*

coding gene significantly more often was observed in the large farms (97.4% vs. 50.0%, p<0.001). In large farms, the most common combinations of genes encoding ESBLs were *blaTEM* and *blaCTX-M* (52.6%, n=20), and in small farms – *blaTEM* and *blaSHV* (41.7%, n=5) (Figure 2.3). In our opinion, one of the main reasons for the higher prevalence of gene *blaCTX-M* in large farms could be the preventive feeding of zinc oxide as a feed additive to pigs. In a recent study using a faecal microbiome model *in vitro*, it was found that the addition of zinc oxide to a faecal suspension increased the proportion of a plasmid-encoded *blaCTX-M-1* *E. coli* compared with the total microbiota; moreover, zinc may induce the expression of resistance genes in *E. coli* strains (Peng et al., 2020). Presumably, also in the large farms included in our study, zinc could promote the spread of plasmid-encoded ESBL-producing *E. coli* strains, as well as the induce the expression of the gene *blaCTX-M*.

Whereas extended-spectrum SHV and TEM  $\beta$ -lactamases are characterized by higher ceftazidime hydrolytic activity (Liakopoulos et al., 2016), but CTX-M – with stronger cefotaxime hydrolytic activity (Bonnet, 2004), this explains the connection that the gene *blaCTX-M*, which is more frequently detected in large pig farms determined ESBL-producing *E. coli* phenotypic resistance to cefotaxime, but the dominant gene *blaSHV* in the small farm is – resistance to ceftazidime.

Analyzing ESBL-producing *E. coli* phenotypic resistance and coding genes, we observed a positive association between the presence of the gene *blaSHV* and phenotypically expressed resistance to amoxicillin-clavulanic acid, ceftazidime and cefixime, but the gene *blaCTX-M* – to cephalexin and several non- $\beta$ -lactam antibiotics – enrofloxacin, tetracycline, gentamicin, trimethoprim and sulfamethoxazole-trimethoprim (Table 2.8).

Some SHV (also TEM)  $\beta$ -lactamase mutants have a single amino acid change at the Ambler position, therefore they overtake the first generation  $\beta$ -lactamase inhibitors (clavulanic acid) (Bush & Bradford, 2019; Cantón et al., 2008), which could explain the observed positive association of *blaSHV* with phenotypic resistance to amoxicillin-clavulanic acid. In turn, the ESBL-encoding gene *blaSHV* and its phenotypically expressed resistance to ceftazidime are explained by the substitution of Glu240Lys, which provides a stronger hydrolytic activity against ceftazidime than cefotaxime (Liakopoulos et al., 2016). Most extended-spectrum  $\beta$ -lactamases are particularly active against first-generation cephalosporins (Paterson & Bonomo, 2005), so the positive association of the gene *blaCTX-M* with the observed resistance to cephalexin is not surprising. On the other hand, the positive association of the *blaCTX-M* gene with the observed resistance to several non- $\beta$ -lactam antibiotics could indicate the prevalence of certain MDR ESBL-producing *E. coli* clones. In addition ESBL genes are most often localized in plasmids and, together with other resistance genes incorporated there, are able to provide co-resistance with aminoglycosides, fluoroquinolones,

trimethoprim-sulfamethoxazole, tetracycline and other antibiotics (Balkhed et al., 2013; Ozgumus et al., 2008). Therefore the gene *bla<sub>CTX-M</sub>* is associated with extensive MDR bacterial strains (Zeynudin et al., 2018).

## **2.2. Effect of feeding probiotics, buckwheat bran and herbal components on general and intestinal health of piglets**

In the pig industry, it is important to improve the feeding strategy of animals, also using various natural plant-based feed additives, which would improve the health of the animals, stimulate growth and give the possibility to reduce the use of antibiotics. In order to evaluate **the general state of health of piglets** before and after the study, we obtained and evaluated hematological and individual serum biochemical indicators. Both at the start of the study (day 14<sup>th</sup>) and at the end of the study (day 56<sup>th</sup>), all hematological and serum biochemical indicators were within the normal limits for the age of the piglets.

One of the most important prerequisites for the health of piglets during the weaning period is the **development of the beneficial intestinal microbiota**. The commensal microbiota, by colonizing the intestines and attaching to the intestinal mucous layer, prevents the colonization of pathogenic bacteria (O'Hara & Shanahan, 2006), in addition, it participates in digestive processes, contributes to the maturation of the intestinal mucosa and the development of the immune system, participating in its induction and functioning (Kamada et al., 2013; O'Hara & Shanahan, 2006).

At the beginning of the study, on the 14th day of piglets' life, we did not observe significant differences in the number of bacteria of the *Enterobacteriaceae* family and *E. coli* in **faeces** between the groups included in the study. On the 35th day of the life of piglets, the number of bacteria from the family *Enterobacteriaceae* was lower ( $p<0.05$ ) in the P group compared to the C group. On the 56th day of the piglet's life, in group H piglets we observed a significantly lower number of *Enterobacteriaceae* and *E. coli* compared to group C, but in group PB the number of *Enterobacteriaceae* ( $p<0.05$ ) and *E. coli* was lower ( $p>0.05$ ) compared to group P (table 2.9).

The positive effect of the use of probiotics on the fecal microbiota was observed faster, already after three weeks of the study, ie one week after weaning the piglets. In *in vitro* studies have shown that probiotics reduce the pH of the digestive tract, thereby reducing the growth of pathogenic bacteria (Gibson, 1999). At the end of the study (on the 56th day of the piglet's life), we found the beneficial effect of the feed components (in the groups H and PB) on the fecal microbiota – reduced number of *E. coli* and *Enterobacteriaceae* bacteria in the faeces. Differences in feed components during exposure could be explained by the fact that after weaning, piglets go through the so-called acute and adaptive

weaning phases. The effect of the acute phase is a reduced feed intake – it can take up to seven days for weaned piglets to learn to eat dry food and take in the required amount of dry food (Pluske et al., 1997). Considering this fact, we believe that the piglets included in our study did not consume enough amount of the diet supplemented with herbal-based ingredients to observe their beneficial effect on fecal microbiota as early as the 35th day of the piglet's life. On the other hand, the effect of probiotics, which were added to the piglets' drinking water, was already observable in the acute phase of piglet weaning.

When evaluating the changes in the **microbiota of the digestive content**, depending on the inclusion of different feed components in the feed of piglets, we concluded that the inclusion of probiotics significantly increased the number of *Lactobacillus* spp. in the contents of the small intestine ( $p<0.05$ ) and large intestine compared to groups H and C (Table 2.10). The herbal supplement had a tendency ( $p=0.064$ ) to reduce the number of *Enterobacteriaceae* in the large intestine contents compared to group C, also we observed the lowest number of *E. coli* in the small and large intestine contents of group H, but the decrease was not statistically significant.

The ability of probiotics to increase the number of *Lactobacillus* spp. in the intestines has also been documented in studies by other authors (Liao & Nyachoti, 2017). Interestingly, combination of probiotics and buckwheat bran (group PB) did not play such a significant role in increasing the number of *Lactobacillus* spp. compared to the P group. Although it has been documented that buckwheat bran have a prebiotic-like activity (Coman et al., 2013; Préstamo et al., 2003), on the other hand, buckwheat bran contains several phenols (Kalinová et al., 2019), and it is proved that they have antibacterial activity (Radovanović et al., 2013; Wang et al., 2013). Thus, the antibacterial activity of the phenols in buckwheat bran was thought to be the reason not only for the reduction of *Enterobacteriaceae* in the digestive content, but also influenced the effectiveness of probiotics ingested through water. The **herbal supplement** (*U. dioica*, *P. major* and *H. perforatum*) chosen by us reduced *Enterobacteriaceae*, but did not affect significantly the number *Lactobacillus* spp. in the digestive content. As known, plants contain many active ingredients that have antibacterial activity, due to which they are considered as one of the most promising alternatives to antibiotics also in pig farming (Omonijo et al., 2018). But at the same time despite the fact that *Lactobacillus* spp., which localize in the digestive tract, belong to Gram-positive bacteria and often are more sensitive to antibacterial substances present in most plants compared to Gram-negative bacteria, being as a part of commensal microbiota resident in a host is incomparably more resistant. It is explained by the fact that commensal microbiota form biomembranes at the intestinal mucus layer (Donaldson et al., 2016; Omonijo et al., 2018). In our opinion, this explains also the ability of the herbal supplement used in the study to modulate successfully the intestinal

microbiota, reducing the number of *Enterobacteriaceae* bacteria, while at the same time not significantly affecting the number of resident *Lactobacillus* spp.

**Antimicrobial resistance of isolated *E. coli*.** Examining fecal samples from 14- and 56-day-old piglets we did not detect the presence of ESBL-producing *E. coli*. But to characterize the effect of feed components on resistant *E. coli* prevalence, we analyzed 80 *E. coli* isolates. From 14-day-old piglets, 66.7% of isolated *E. coli* were resistant to at least one antibiotic class, while from 56-day-old piglets – 50%. This shows that by limiting the use of antibiotics in piglets, the spread of resistance tends to decrease. Despite this, the prevalence of resistance was generally assessed as high. For *E. coli* isolated before the study, we observed more frequent resistance to ampicillin (42%) and trimethoprim (33%), while at the end of the study more often resistance was observed to tetracycline [in the P group (50%), PB (50%) and H (44%)] and against trimethoprim [in P (50%) and PB (44%) groups]; only in the control group was observed resistance to chloramphenicol (38%) and cefotaxime (8%). The development of the intestinal microbiota of piglets is significantly influenced by the environment and the microbiota of the sow (Langlois et al., 1986). Researchers have observed that the high resistance of bacteria isolated from the digestive tract of young animals is not necessarily related to the use of antibiotics, but is related to the widespread distribution of genetic resistance elements among the intestinal microbiota. By switching to antibiotic-free pig farming, it is possible to reduce the level of resistant isolates, but it is likely that it will not be possible to completely eliminate antibiotic-resistant genes in the fecal microbiota (Mathew, 2001). Fact, that piglets in the control group during the post-weaning period received zinc supplementation (as well as it is common practice on this farm), explains the high prevalence of MDR *E. coli* both in the control group and in the other research groups. The role of heavy metals in the selection of multidrug-resistant bacteria in the digestive tract of piglets and in the environment is also widely described in the scientific literature (Bednorz et al., 2013; Ciesinski et al., 2018). In our opinion, the use of zinc oxide has contributed to the high prevalence of MDR bacteria in the farm environment, which is reflected in the results of our study. But despite that, at the end of the study, comparing phenotypic diversity of the resistant *E. coli* isolated from the research groups, the most variations were observed in the C group [7 different phenotypes, resistance to a total of 8 antibiotics (AB)], followed by the P group (6 different phenotypes, resistance to a total of 6 AB) and the lowest in the PB and H groups (4 different phenotypes, resistance in total to 5 AB) (Table 2.11). There are authors who observed the antagonistic effect of probiotics on the antibiotic resistant gene transfer, but this mechanism of action remains unclear (Moubareck et al., 2007). We can see that the herbal supplement also reduces the phenotypic diversity of resistant *E. coli*, but more research is needed to clarify the mechanisms of action.

The intestinal epithelium and immune cells together with the mucus layer provide the first barrier against the intestinal microbiota, pathogens and external antigens. Weaning from the sow causes stress to the piglets, moreover, the change of environment, feed and social hierarchy makes it a critical period in the life of pigs; it causes gastrointestinal dysfunction, breakdown of the mucosal barrier and results in intestinal inflammation and the development of diarrhea (Moeser et al., 2007).

**During the histopathological examination** we observed mild to moderate chronic diffuse enterocolitis with mild to moderate infiltration of eosinophilic leukocytes, lymphocytes and plasma cells in the histological sections of the small (*jejunum*) and large (*colon*) intestines from all research groups, 56-day-old piglets. When assessing the severity of inflammation, we did not find significant differences between the study groups, neither in the small ( $p=0.11$ ) nor the large ( $p=0.12$ ) intestine. As mentioned above, the stress caused by the weaning period, changes in the diet and environment of piglets, can result in significant functional and morphological changes in the gastrointestinal tract of piglets, which is often called "weaning-related intestinal inflammation" (Moeser et al., 2007).

As important predictors of intestinal health are considered **such histomorphological measurements** as villus height (VH), crypt depth (CD) and VH:CD ratio (Han et al., 2013). Enriching piglets basic feed with probiotics and feed ingredients of plant origin significantly increased: the height of the intestinal villi in the H group (+35%,  $p<0.05$ ), the P group (+17%,  $p<0.05$ ) and the PB group (+12%,  $p<0.05$ ). When evaluating the VH:CD ratio, it was found to be significantly higher for the H, P and PB groups. In the colon, in the groups P, PB and H we found deeper crypts ( $p<0.05$ ) compared to group C (Table 2.12).

The beneficial effect of herbal supplement on intestinal histomorphological indicators is mainly related to their ability to reduce the bacterial pressure in the intestine (Zeng et al., 2015). In turn, probiotics, when entering the intestines, adhere to the mucus layer and enterocytes, colonize certain niches and cause the so-called "colonization resistance" and protect the intestinal villi against pathogens. Reduced toxicity and better absorption of nutrients promote growth and regeneration of the villi (Donaldson et al., 2016; Song et al., 2014). Polysaccharides present in buckwheat bran and the herbal supplement show properties similar to prebiotics (Kamada et al., 2013; Yahfoufi et al., 2018). When the lactic acid bacteria ferment those polysaccharides, volatile fatty acids (SCFA – acetate, propionate, butyrate) are formed, and this is an important source of energy for the growth of colonocytes (Hooper et al., 2002). So probiotics and plant-based feed ingredients could contribute to the depth of crypts in the colon. In addition, butyrate is an active inflammatory inhibitor that stimulates mucosal regeneration (Cornick et al., 2015).

In the intestines between the cylindrical squamous epithelium the scattered **goblet cells (GC)** are located, which secrete glycoproteins and form a mucus layer and cover epithelial cells. We observed a lower ( $p<0.05$ ) GC density in the villi of the small intestine of group H, whereas probiotics increased the number of GCs in the crypts of the large intestine (Table 2.13).

**Glycoproteins produced by goblet cells (GC) are divided into neutral (PAS+) and acidic (AB+)** subtypes. Both AB+ and PAS+ mucins increase the viscosity of the mucus layer for epithelial protection, but AB+ mucins specifically protect against bacterial translocation (Cao & Wang, 2009). Compared to group C piglets, probiotics increased the number of AB+GC in the villi of the **small intestine** ( $p<0.05$ ), tendentially – also in the crypts of the **small** and **large** intestines, while the herbal supplement decreased ( $p<0.05$ ) the density of AB+GC in the villi of the **small** intestine. In group C piglets, we observed a reduced ( $p<0.05$ ) number of PAS+GC in the **colon** crypts.

About the ability of probiotics to increase GC proliferation and differentiation has been reported by the authors previously (Desantis et al., 2019; El Aidy et al., 2013). Probiotics, by colonizing the mucus layer and releasing various end products of mucin fermentation, bioactive factors, activate various signal cascades and secretory elements, so acting directly on GC (Meslin et al., 1999; Schutte et al., 2014). However, probiotics are able to regulate mucin gene expression indirectly via the host's immune responses – by acting on them with structural elements of bacteria (lipopolysaccharides (LPS), flagellin A, lipoteichoic acids (LTA) and several metabolites (SCFA, adenosine triphosphate) (Dharmani et al., 2009). In turn, the herbal supplement we used, thanks to its antimicrobial properties, was able to reduce the pressure caused by the microbiota in the digestive tract; consequently, it could reduce GC density in the *jejunum* villi.

Based on the results of **immunohistochemical examinations of our study**, the probiotics and plant-based feed components included in the study increased the **proliferation of epithelial cells (Ki67+)** in crypts of *jejunum*, but probiotics+buckwheat bran and herbal supplement increased proliferation in both – crypts of *jejunum* and *colon* (Figure 2.4). Scientists have found several mechanisms by which probiotics can promote the proliferation of epithelial cells: firstly, certain strains of probiotics reduce the expression of the integrin-related kinase gene in enterocytes, therefore decrease cytoskeletal  $\beta$ -actin levels in the basement membrane and this subsequently destabilizes the interaction of enterocytes with this basement membrane and increases cell migration velocity along the crypt-villi axis; secondly, probiotics increase cell proliferation in the crypts (Preidis et al., 2012) by interacting with and regulating intestinal stem cells (Preidis et al., 2012; Walker et al., 2009); third, lactate plays a critical role in the development of intestinal stem cells (Lee et al., 2018).

The inclusion of plant-based feed ingredients (in the PB and H groups) significantly increased the proliferation of epithelial cells in the colon. Buckwheat bran is a source of fiber (Taylor & Emmambux, 2008), but plants contain a lot of glycosides and carbohydrates (Feng et al., 2018). Significantly, that plants and buckwheat bran are important raw materials for SCFA production (Ushida & Hoshi, 2002; Zhao et al., 2019). SCFAs absorbed in the large intestine act as “fuel” for mucosal epithelial cells (Cook & Sellin, 1998). So the inclusion of additional fiber in pig diets could increase SCFA production in the large intestine and promote proliferation of colonocytes.

An important role in the host's defense against pathogens is played by the mucosal immune system, which is implemented by the "gut-associated lymphoid tissue" (GALT). They include organized tissue (Peyer's patches) and scattered immune cells [in the basal layer of the mucosa (*lamina propria*) and between epithelial cells (intraepithelial lymphocytes – IEL)] (Mowat & Viney, 1997). Homeostasis of the intestinal tract is ensured by a state of weak reaction against the resident microbiota and at the same time active readiness against pathogens (Maeda et al., 2001). Intestinal epithelial, dendritic and M cells directly perceive the antigens of mucosal microbiota, its metabolites and induce the formation of *toll-like* receptors to bind T and B lymphocytes and promote immune responses (Gutzeit et al., 2014). We paid particular attention to the distribution of T lymphocytes, as they play a vital role in maintaining intestinal homeostasis and activating the immune response against pathogens (Van Wijk & Cheroutre, 2010).

The density of **intraepithelial CD3+ cells (IEL)** in the small intestine of piglets was higher ( $p<0.05$ ) in the P group, but significantly decreased in the H group ( $p<0.05$ ). In the large intestine, a higher density of IELs was observed in all study groups where probiotics or plant-based animal feed components were added to the basic feed ration (Figure 2.5).

Assessing the relative amount of **CD3+ cells** in the intestinal **mucosal lamina propria**, we found that it was higher ( $p<0.05$ ) in the villi part of the small intestine of piglets of P and PB groups, but in the crypts part of the large intestine it was significantly higher in piglets of P, PB and H groups (Figure 2.6).

When evaluating the relative amount of CD3+ cells in the collections of **intestinal lymphoid tissue** and the **submucosa of the large intestine**, we found that probiotics and herbal supplement increased ( $p<0.05$ ) the relative amount of CD3+ cells in the interfollicular and follicular+dome areas of Peyer's patches (Figure 2.7), but we did not observe statistically significant differences between the study groups as assessed by the distribution of CD3+ cells in the submucosa of the large intestine.

Our results reveal that **feeding probiotics** to piglets increases the density of IELs, distribution of T lymphocytes in the *lamina propria* (LP) and Peyer's patches (PP). Intestinal microbiota plays the most essential role in the

development of the host's immune system, which is proven by studies in sterile animal models (*germ-free*), where there are observed reduced PPs, significantly reduced number of T lymphocytes in PPs and tissues (Maeda et al., 2001). The structural elements of probiotics (LPS, LTA) are important stimulators of innate and adaptive immunity (Dharmani et al., 2009). So many authors have reported a higher number of T lymphocytes in PP and LP after including probiotics in the diet of piglets (Smelt et al., 2013; Suthongsa et al., 2017). In most cases, a higher number of T lymphocytes in LP is achieved by an increase in the number of regulatory T lymphocytes (Smelt et al., 2013; Suthongsa et al., 2017). There are reports on the role of probiotics in increasing the number of IELs in the intestine of piglets (Rieger et al., 2015), being able to respond quickly to pathogen-infected or damaged cells, preventing their systemic spread (Van Wijk & Cheroutre, 2010). Considering that the probiotics used in our study increased the number of T lymphocytes both in the induction (PP) and effector sites (LP, IEL) of the immune system of the intestinal mucosa, the use of probiotics can be considered as giving an active immunomodulatory effect.

**The combination of probiotics and buckwheat bran** increased the number of IELs and T lymphocytes in the LP, mainly in the colon, where it is thought that buckwheat bran was fermented to SCFAs, including butyrate (Koh et al., 2016). Butyrate can affect immune cells, both indirectly through modulation of the microbiota, and directly – influencing the immune cells in the intestinal mucosa, increasing the number of regulatory T lymphocytes and reducing the activity of effector T lymphocytes, thus promoting innate immune tolerance (Gonçalves et al., 2018; Wu et al., 2017). Interestingly, the combination of probiotics + buckwheat bran did not increase the number of IELs in the small intestine, which could again indicate an inhibitory effect of buckwheat bran on the included probiotics.

We observed that **the herbal supplement** reduced the number of IELs in the *jejunum*, but increased the number of T lymphocytes in both the interfollicular zone and the PP. On the other hand, an ambiguous effect of exposure was observed on the density of T lymphocytes in LP. On the one hand, previous reports have emphasized the ability of plant polysaccharides to stimulate immunocompetent cells in the PP (Georgiev et al., 2017), but on the other hand, medicinal plants have antibacterial properties (Field et al., 2017); by modulating or reducing the bacterial load, the activation of *toll-like* receptors is also reduced, thus the immune stimulation is also reduced (Smith & Garrett, 2011), which could explain the reduced number of IELs and the amount of T lymphocytes in the LP. In addition, the plants used in the study (*P. major* and *H. perforatum*) are characterized by a strong anti-inflammatory effect (Albert et al., 2002; Beara et al., 2010), which in turn could reduce the migration of T lymphocytes to the villous epithelium (Michiels et al., 2010). The increase of IEL and T lymphocytes in the *colon* part of the large intestine was most likely

influenced by the potential increase of SCFA due to the prebiotic properties of polysaccharides present in plants (Yahfoufi, et al., 2018).

The composition of fatty acids is closely related to **the nutritional value of meat**, but the intramuscular adipose tissue of animals, especially pigs, is characterized by a high content of saturated fatty acids. Saturated fatty acids are a risk factor for cardiovascular diseases (CVD), whereas unsaturated fatty acids improve metabolism, reduce the risk of CVD, reduce inflammation symptoms (Shramko et al., 2020).

Analyzing the fatty acid content of *m. Longissimus thoracis et lumborum* muscle tissue, we found that P group piglets have a higher ( $p<0.05$ ) percentage of  $\alpha$ -linolenic acid and palmitoleic acid, but a lower ( $p<0.05$ ) – of stearic acid, and we also observed a lower ( $p<0.05$ ) saturated fatty acid content and a higher polyunsaturated and saturated fatty acid content ratio (PUFA:SFA) compared to group C piglets. The beneficial effect of probiotics on the fatty acid profile of muscle tissue, by reducing saturated and increasing the amount of monounsaturated and polyunsaturated fatty acids in muscle tissue, has also been observed by Ross and co-authors (Ross et al., 2012). In addition, only the muscle tissues of P group piglets had a PUFA:SFA ratio above 0.4, which corresponds to a healthy fatty acid profile basic indicator according to the recommendations of the Ministry of Health of the United Kingdom.

### **2.3. Characterization of the chemical composition of essential oils (EO), antibacterial activity and the effect of different supplements on the efficacy of EO against ESBL-producing *E. coli***

Plants from the *Lamiaceae* family have been used in traditional medicine for centuries, but also in modern medicine, nowadays more and more attention is paid to them in veterinary medicine and the food industry, because their EOs have strong antimicrobial, antioxidative and anti-inflammatory activity (Nieto, 2017).

Comparing **the chemical composition of Latvian and commercial EOs**, we found that commercial EOs in most cases contain a higher concentration (30–56%) of aromatic monoterpenoids (thymol, carvacrol) than Latvian EOs (12–37%), except for *T. vulgaris* EOs, where the content of EOs did not differ significantly (31% and 30%). It should be emphasized that we observed a significantly higher percentage concentration of  $\gamma$ -terpinene (17.8–22.4%) in the composition of all Latvian EOs, while *p*-cymene in higher concentrations more often was observed in commercial EOs (Table 2.14).

The authors (Ložionė & Venskutonis, 2006) have reported that the northern climate negatively affects the synthesis of volatile phenolic compounds, which on the one hand could explain the lower concentration of thymol and carvacrol also in the EOs we obtained. But on the other hand, we did not observe significant differences between the amount of total aromatic volatiles in Latvian and commercial *T. vulgaris* EO. So it is assumed that plant genetics, not climate, could mainly affect the synthesis of aromatic volatile compounds in plants.

According to the study **results, the antibacterial activity** of all EOs analyzed were characterized by bactericidal activity, as we did not observe significant differences between the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) of the EOs in relation to both reference and fecal *E. coli*.

The antibacterial efficiency of EO against *E. coli* is significantly influenced by such factors as the origin of the EO (commercial, Latvian) and the type of plant species. Latvian EOs had higher ( $p<0.001$ ) MIC values compared to commercial EOs, and we observed significant ( $p<0.001$ ) differences between EO plant species. From Latvian EOs, the lowest MIC value was *S. montana*, and the highest – *T. serpyllum*, while from commercial EOs, the lowest MIC value also was *S. montana*, but we did not observe significant differences between *T. vulgaris* and *T. serpyllum* (Figure 2.8).

Other researchers have reported that non-oxygenated hydrocarbons are indicators of weak antibacterial activity in EOs (Guimarães et al., 2019). Considering that Latvian EO was characterized by an abundance of  $\gamma$ -terpinenes, this explains the reduced antibacterial activity of those EO. Non-oxygenated monoterpenes reduce the water solubility of oxygenated monoterpenes, resulting in an antagonistic action of the first against oxygenated monoterpene hydrocarbons (Cox et al., 2001).

In turn, the relatively high concentration of *p*-cymene in commercial EOs has greatly contributed to the antibacterial activity of them against *E. coli*. The synergistic effect of *p*-cymene and carvacrol has also been confirmed in other studies (Ultee et al., 2002), where the hydrophobic properties of *p*-cymene contribute to carvacrol penetration through the bacterial cell membrane, thereby contributing to the destabilization of the bacterial cell membrane and carvacrol inhibitory activity (Rattanachaikunsopon & Phumkhachorn, 2010; Ultee et al., 2002).

Despite the fact that the Latvian and commercial *T. vulgaris* EOs used in the study showed equivalent amounts of aromatic, oxygenated and non-oxygenated monoterpenes, the antibacterial activity of the two EOs differed significantly. This observation reveals the ability of a numerical minority of individual molecules to significantly influence the antibacterial activity of EOs. For example, commercial *T. vulgaris* EO contained higher amount of limonene and  $\beta$ -linalool, which both have strong antibacterial activity (Cosentino et al.,

1999; Guimarães et al., 2019), moreover, cannot be excluded the synergy of thymol and  $\beta$ -linalool and/or limonene, as it was observed in the case of the interaction between carvacrol and *p*-cymene. Likewise, the minority of individual molecules were able to affected significantly the activity of *T. serpyllum* EO, where despite the fact that it contained a very high concentration of carvacrol (53.34%, 2334mg kg<sup>-1</sup>), the ability of a its antibacterial activity was significantly lower than expected. A similar phenomenon was also observed by Wesolowska and co-authors (Wesolowska et al., 2015), suggesting that it could be the result of the antagonistic interaction of individual EO compounds. For example, Gallucci and co-authors have reported that carvacrol and  $\beta$ -myrcene cause antagonistic effects by interacting on antibacterial activity against *E. coli* and Gram-positive bacteria (Gallucci et al., 2009). It should be emphasized that we found the highest amount of  $\beta$ -myrcene in commercial *T. serpyllum* EO.

Based on the results of our study, the supplements alone-both 3% NaCl and 1mM caprylic acid did not cause the growth suppression or bactericidal effect against any of the *E. coli* included in the study, but at the same time, **supplementing commercial EO** with 3% NaCl ( $p<0.001$ ) or 1 mM caprylic acid ( $p=0.012$ ) significantly increased their antibacterial activity against *E. coli*. Complementing *T. serpyllum*, *T. vulgaris* and *S. montana* EO with caprylic acid, the MIC value decreased by 29% ( $p=0.810$ ), 51% ( $p=0.011$ ) and 64% ( $p=0.017$ ), respectively, while supplementing these same EOs with 3% NaCl, the MIC value decreased by 63% ( $p=0.018$ ), 78% ( $p<0.001$ ) and 69% ( $p=0.001$ ) (Figure 2.9).

Caprylic acid is a representative of saturated fatty acids, whose antibacterial activity is characterized by the ability of fatty acids to interact with bacterial cell membranes (Yoon et al., 2018) and disrupt electron transfer reactions, as well as cause disturbances in oxidative phosphorylation processes (Desbois & Smith, 2010; Yoon et al., 2018). The results of our study are consistent with the reports of other researchers that there is a synergistic interaction between EOs/phenolics and medium chain fatty acids (MCFA) (Huláneková & Bořilová, 2011; SA Kim & Rhee, 2016; Rani et al., 2022); therefore, to achieve the desired antibacterial activity, it is necessary to use a lower concentration of EO, when used together with caprylic acid.

It is known that high external osmotic pressure caused by a hypertonic environment promotes osmotic shock to bacteria (Wood, 2015), but the results of our study confirm that *E. coli* is able to survive successfully and even grow in an environment of increased osmolarity (3% NaCl). However, the diversion of energy within the bacterial cell to osmoregulatory systems has contributed to the effects of EOs in hypertonic environments. The hydrophobicity of aromatic monoterpenoids of EO's promotes their accumulation in the phospholipid double layer of the bacterial cytoplasmic membrane and increases its permeability (Ben Arfa et al., 2006). In the same time the free hydroxyl group present in the

molecule of aromatic monoterpenoids, affects ion exchange reactions, reducing the synthesis of adenosine triphosphate, which is vital for bacteria, and when these energy reserves are depleted, the bacterial cell death is introduced (Ben Arfa et al., 2006; Ultee et al., 2002). The results of our study confirm that the use of 3% NaCl together with EO significantly reduces the required concentration of EO to ensure antibacterial activity against *E. coli*.

Comparing the effectiveness of each EO (with/without additives) **against ESBL-producing** and **ESBL non-producing** *E. coli*, it was found that pure *S. montana* EO has significantly lower MIC values against ESBL non-producing *E. coli* compared to ESBL-producing *E. coli*, a similar trend was also observed for *T. serpyllum* EO. On the other hand, *T. vulgaris* EO supplemented with 3% NaCl tended to have lower MIC values against ESBL-producing *E. coli* than ESBL non-producing *E. coli*, and the other supplemented EOs were equally effective against both ESBL-producing and ESBL non-producing *E. coli* (Figure 2.10).

Comparing the antibacterial effectiveness of each EO (with/without additives) **against MDR** and **non-MDR** *E. coli*, we found that pure *S. montana* EO was significantly more effective against non-MDR *E. coli*, but *T. vulgaris* EO supplemented both with caprylic acid ( $p=0.061$ ), and with 3% NaCl ( $p=0.032$ ) was more effective against *E. coli* with a higher level of resistance ie to MDR *E. coli* than to non-MDR *E. coli* (Figure 2.11).

ESBL-producing *E. coli* resistance is related not only to the presence of hydrolyzing  $\beta$ -lactamases, but also to the reduced permeability of the outer membrane due to the loss or modification of porins (Khalifa et al., 2021; Pagès et al., 2008). In addition, efflux pumps are a common resistance mechanism of MDR bacteria, which also have physiological functions, especially under stress in response to environmental and physiological signals (Sun et al., 2014). In our opinion, the decrease in membrane permeability in ESBL-producing *E. coli* and the presence of an efflux pump in MDR *E. coli* may have been the main reasons for the lower activity of some pure EOs.

In our study, EOs supplemented with caprylic acid or NaCl were equally effective against ESBL and non-ESBL, as well as MDR and non-MDR *E. coli*. In addition, we found that *T. vulgaris* EO enriched with the NaCl is more effective against *E. coli* with higher levels of resistance. This suggests that the enriched EOs are able to act on the bacterial cell in a more comprehensive manner and this in turn could be a more successful solution to bypass the bacterial resistance mechanisms. Other authors have observed also other beneficial effects of solutions containing NaCl, for example, that they reduce the formation of biomembranes and bacterial motility (F. Li et al., 2021), while the abiotic stress caused by the saline solution could promote the elimination of plasmids and the inhibition in the horizontal transfer of plasmids (L. Tan et al., 2019).

## CONCLUSIONS

1. In pig farms there is a very high level of resistance of commensal *E. coli* against tetracycline (54.63%), high – ampicillin (32.03%), trimethoprim (24.07%), sulfamethoxazole-trimethoprim (22.44%) and amoxicillin-clavulanic acid (22.28), but low – fluoroquinolones [enrofloxacin (8.78%), ciprofloxacin (3.58%)], gentamicin (5.69%), cefazolin (4.55%) and third generation cephalosporins [cefotaxime (1.46%)]. Antibiotic-resistant *E. coli* more often we isolated from large farms and in pigs from 4 to 12 weeks of age, which indicates a wider use of antibiotics of a different spectrum in large farms and in the relevant stage of pig breeding.
2. With the selective differential method, we found a relatively high (23.4%) prevalence of ESBL-producing *E. coli* in pig farms, and we found its presence more often in sows (41.6%) and six-week-old piglets (35.1%). Although we observed more frequent and higher incidence of ESBL-producing *E. coli* in large farms (up to 64%), though a high (47.5%) presence of it can also be detected in small farms, indicating that the size of the farm is not always a determining factor for the higher prevalence of resistant bacteria.
3. There is a very high (96%) prevalence of multidrug resistance observed among ESBL-producing *E. coli*, and in large farms wider resistance phenotypes are observed. The widespread use of amoxicillin, cephalosporins, fluoroquinolones, as well as the addition of zinc oxide to feed could be contributing factors to the spread of multidrug-resistant ESBL-producing *E. coli* on farms.
4. In Latvian pig farms most frequently found ESBL coding genes were – *bla<sub>TEM</sub>* (94%) and *bla<sub>CTX-M</sub>* (86%), less often *bla<sub>SHV</sub>* (48%). In the small farms significantly more often we observed *bla<sub>SHV</sub>*, while in the large ones – *bla<sub>CTX - M</sub>*. We found statistically significant associations between the gene *bla<sub>SHV</sub>* and resistance against ceftazidime, cefixime and amoxicillin-clavulanic acid, and between the gene *bla<sub>CTX-M</sub>* – against cefotaxime, cephalexin and several non-β-lactam antibiotics, thus confirming the fact that ESBL-encoding genes are often incorporated among other resistance-determining genes.
5. Inclusion of probiotics-containing supplementary feed "ProbioHelp" in the feed, reduced ( $p<0.05$ ) the number ( $\log \text{cfu g}^{-1}$ ) of *Enterobacteriaceae* (on average by 49%) and *E. coli* (on average by 43%) in the piglet faeces already on the 35th day of their life. While at the end of the study (on the 56th day of piglets life), we found increase ( $p<0.05$ ) of *Lactobacillus* spp. in the intestinal content by an average of 23% compared to control group animals.

6. Addition of plant origin ingredients (*Plantago major*, *Urtica dioica*, *Hypericum perforatum* 1:1:1) to the feed of piglets not only reduced ( $p<0.05$ ) the number ( $\log \text{cfu g}^{-1}$ ) of *Enterobacteriaceae* (on average by 39%) and *E.coli* (on average by 36%) in the faeces of piglets on the 56th day of their life, compared to animals of the control group, but also reduced phenotypic diversity of resistant *E. coli*. So, inclusion of plant origin ingredients in the feed could contribute to limiting the spread of antibacterial resistance in pig farms.
7. Complimentary feed containing probiotics "ProbioHelp" increased ( $p<0.05$ ) the length of *jejunum* villi, VH:CD ratio, proliferation of enterocytes, the number of goblet cells producing acidic mucins in the small and, tendentially, also in the large intestine; while higher ( $p<0.05$ ) density of intraepithelial lymphocytes in the intestine, as well as the relative amount of T lymphocytes in Peyer's plates and *lamina propria* compared to the control group, may indicate the immunomodulatory effect of the supplement.
8. Addition of plant origin feed ingredients (*Plantago major*, *Urtica dioica*, *Hypericum perforatum* 1:1:1) to piglet feed, increased ( $p<0.05$ ) the length of *jejunum* villi, VH:CD ratio and proliferation of epithelial cells; while a lower ( $p<0.05$ ) density of intraepithelial lymphocytes in the *jejunum*, as well as a higher ( $p<0.05$ ) relative amount of T lymphocytes in the Peyer's patches and in *lamina propria* of colon part, compared to the control group, may indicate the anti-inflammatory and immunomodulatory properties of the herbal ingredients.
9. Latvian origin essential oils of *T. serpyllum*, *T. vulgaris* and *S. montana* show higher ( $p<0.05$ ) MIC and MBC values against *E. coli*, which can be explained by the presence in the oils the relatively high hydrocarbon monoterpenes, indicating the need for a higher concentration of essential oils of Latvian origin for ensuring antibacterial effectiveness.
10. Addition of caprylic acid to the commercial essential oils of *T. serpyllum*, *T. vulgaris* and *S. montana* allows to reduce the required amount of the aforementioned oils by 29%, 51% and 64%, respectively, while enrichment with 3% NaCl – by 63%, 78% and 69%. Enriched *T. vulgaris* essential oil showed a trend towards higher efficacy against ESBL-producing *E. coli* compared to antibiotic-susceptible *E. coli* strains, thus thyme essential oil could be successfully used in multidrug-resistant *E. coli* control.

## PRACTICAL RECOMMENDATIONS

1. In order to prevent the rapid spread of ESBL-producing bacteria in pig farms, it is necessary to screen for the presence of ESBL-producing *E. coli*, especially:
  - a. if diarrhea is often detected in piglets on the farm,
  - b. zinc oxide is used orally as a preventive measure,
  - c. or fluoroquinolone and  $\beta$ -lactam antibiotics are used for treatment.
2. In order to reduce the spread of ESBL-producing bacteria in productive animals, we recommend to use critically important antibiotics (3rd and 4th generation cephalosporins, fluoroquinolones) only if there are no alternative antibiotics of a lower category and the need for use is justified by the results of antibiotic sensitivity testing.
3. We recommend to add to the basic feed for piglets from the 14<sup>th</sup>-56<sup>th</sup> day of the life, the herbal origin (*Plantago major*, *Urtica dioica*, *Hypericum perforatum* 1:1:1) supplement in the amount of 1.5% – to modulate the intestinal microbiota during the adaptive weaning period of piglets, to improve intestinal health and promote immunomodulatory activity in the intestinal tract. The herbal supplement not only reduces the number of *E. coli* in the faeces, but also the phenotypic diversity of resistant isolates.
4. Enriching essential oils with 1mM caprylic acid or 3% NaCl addition, can allow to reduce the needed amount of essential oil significantly.
5. We recommend the use of enriched *T. vulgaris* essential oil in the development of surface disinfectants as a component for the control of ESBL-producing *E. coli*.