

Latvijas Lauksaimniecības universitāte
Veterinārmedicīnas fakultāte
Klīniskais institūts

Latvia University of Life Sciences and Technologies
Faculty of Veterinary Medicine
Clinical Institute



Mg. med. vet. **Santa Skuja** 

**AUGĀ SEGU AIZTURES ĀRSTĒŠANAS METOŽU
SALĪDZINOŠS VĒRTĒJUMS UN TO IETEKME UZ
GOVJU TURPMĀKO LAKTĀCIJU UN REPRODUKCIJU**

***COMPARATIVE ASSESSMENT OF TREATMENT
METHODS OF RETAINED FETAL MEMBRANES AND
THEIR EFFECTS ON THE SUBSEQUENT LACTATION
AND REPRODUCTION IN COWS***

Promocijas darba KOPSAVILKUMS

Zinātniskā doktora grāda (Ph.D) iegūšanai
Veterinārmedicīnas zinātnē

SUMMARY
of the Doctoral thesis for the scientific degree of Ph.D.

Jelgava 2021

Promocijas darbs izstrādāts:

Latvijas Lauksaimniecības universitātes Veterinārmedicīnas fakultātes

Klīniskajā institūtā;

Tērvetes novada un Jelgavas novada divos slaucamo govju ganāmpulkos;

Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskajā institūtā "BIOR";

P. Stradiņa Klīniskās universitātes slimnīcas Patoloģijas institūta laboratorijā;

SIA "Centrālā laboratorija".

Research has been carried out at the:

the Clinical Institute of the Faculty of Veterinary Medicine, Latvia University of Life Sciences and Technologies;

In two dairy herds of Tērvete's region and Jelgava's region;

Institute of Food safety, Animal Health and Environment "BIOR";

In the laboratory of the Institute of Pathology of P. Stradiņš Clinical University Hospital;

Ltd. "Central Laboratory".

Promocijas darba zinātniskā vadītāja:

Scientific supervisor:

Profesore emeritus Dr. med.vet./professor emeritus Dr. med.vet. **Vita Antāne**

Oficiālie recenzenti:

Official reviewers:

- LLU Profesore, Dr. med.vet./professor, Dr. med.vet., LZP korespondētājocekle /the Corresponding member of the Latvian Academy of Sciences **Anda Valdovska**
- RSU profesore, Dr. habil. med., Dr. med., LZA īstenā locekle /RSU professor, Dr. habil. med., Dr. med., the Full member of the Latvian Academy of Sciences **Māra Pilmane**
- LSMU profesors, Dr. med.vet./ professor, Dr. med.vet. **Alius Pockevičius**

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2021.gada 27.decembrī, pulksten 11:00, LLU Veterinārmedicīnas fakultātē, Jelgavā Kr.Helmaņa ielā 8, 100.B auditorijā.

The defense of this theses will take place at Latvia University of Life Sciences and Technologies Faculty of Veterinary Medicine, Jelgava, Kr.Helmana Street 8, auditorium No 100B, on 27th. December, 2021 at 11:00 o'clock.

Ar promocijas darbu var iepazīties Latvijas Lauksaimniecības universitātes Fundamentālajā bibliotēkā Jelgavā, Lielā ielā 2 un <http://llufb.llu.lv/lv>

The thesis is available at the Fundamental Library of the Latvia University of Agriculture, Lielā street 2, Jelgava and <http://llufb.llu.lv/en>

SATURA RĀDĪTĀJS

IEVADS.....	7
Promocijas darba uzdevumi	8
Darba zinātniskā novitāte.....	8
PĒTĪJUMU REZULTĀTU APROBĀCIJA	9
MATERIĀLS UN METODES	10
Materiāla raksturojums	10
Cietstāves perioda ilgums pētījuma govīm.....	12
Izslaukums un piena somatisko šūnu skaits pētījuma govīm.....	12
Reprodukcijas rādītāji pētījuma govīm.....	13
Pētījuma gaitas apraksts	13
Pētījumā izmantoto metožu apraksts.....	15
Vispārējā un speciālā klīniskā izmeklēšana	15
Ultrasonorāfija govīm bez augļa segu aiztures un ar to	16
Asins morfoloģiskā un bioķīmiskā izmeklēšana govīm bez augļa segu aiztures un ar to	16
Mikrobioloģisko paraugu iegūšana no dzemdes un to izmeklēšana govīm bez augļa segu aiztures un ar to	17
Dzemdes biopsiju histoloģiskā izmeklēšana.....	18
Dzemdes biopsiju imūnhistokīmiskā izmeklēšana	19
EKONOMISKO IZMAKSU APRĒĶINS	20
DATU STATISKĀ APSTRĀDE.....	21
PĒTĪJUMA REZULTĀTI UN DISKUSIJA.....	22
Govs dzemdes un olnīcu rektālās un ultrasonogrāfiskās izmeklēšanas rezultāti	22
Asiņu morfoloģisko un bioķīmisko rādītāju rezultāti govīm bez augļa segu aiztures un ar to.....	23
Dzemdes dobuma satura mikrobioloģisko izmeklējumu vērtējums govīm bez augļa segu aiztures un ar to	28
Histoloģiskie izmeklēšanas rezultāti govīm bez augļa segu aiztures un ar to.....	31
Imūnhistoloģiskie rezultāti govīm bez augļa segu aiztures un ar to.....	33
Augļa segu aiztures ārstēšanas metožu ietekme uz turpmāko laktāciju	34

Augļa segu aiztures ārstēšanas metožu ietekme uz reprodukcijas rādītājiem govīm.....	36
Ekonomiskās izmaksas dažādām augļa segu aiztures ārstēšanas metodēm...38	
SECINĀJUMI.....	42
IETEIKUMI PRAKSEI	43
ZINĀTNISKĀS PUBLIKĀCIJAS UN TĒZES.....	44

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION.....	46
OBJECTIVES OF THE DOCTORAL THESIS.....	47
SCIENTIFIC NOVELTY OF THE RESEARCH.....	47
APPROBATION OF THE RESEARCH RESULTS	48
MATERIAL AND METHODS.....	49
CHARACTERISTICS OF THE MATERIAL	49
Dry period length for study cows	50
Milk yield and somatic cell count in the milk of cows included in the study	51
Reproduction rates in the cows included in the study.....	51
DESCRIPTION OF THE PROGRESS OF THE STUDY.....	52
DESCRIPTION OF THE METHODS USED IN THE STUDY	52
General and specific clinical examination	52
Ultrasoundographic examination of cows with and without fetal membrane retention.....	53
Morphological and biochemical blood tests of cows with and without fetal membrane retention	53
Collection of microbiological samples from the uterus and examination thereof in cows with and without fetal membrane retention	54
Histological examination of biopsies of the uterine endometrium	55
Immunohistochemical examination of biopsies of the uterine endometrium	56
CALCULATION OF ECONOMIC COSTS	58
STATISTICAL DATA PROCESSING.....	59
RESEARCH RESULTS AND DISCUSSION.....	60
Results of rectal and ultrasoundographic examination of the uterus and ovaries of the cows	60
Results of blood morphological and biochemical parameters in cows with and without fetal membrane retention	61
Evaluation of microbiological examinations of uterine cavity content in cows with and without fetal membrane retention	63

Results of histological examination of the uterus in cows with and without fetal membrane retention.....	64
Results of immunohistological examination of the uterus in cows with and without fetal membrane retention.....	66
Effect of fetal membrane retention treatment methods on subsequent lactation	66
Effect of fetal membrane retention treatment methods on reproduction parameters in cows	67
Economic costs for different treatment methods for fetal membrane retention	69
CONCLUSIONS	72
RECOMMENDATIONS FOR PRACTICE	73
SCIENTIFIC PUBLICATIONS AND THESES.....	74

IEVADS

Augļa segu aizture ir patoloģisks stāvoklis, ko izraisa trešās dzemdību stadijas izpalikšana dzemdību laikā, t. i., nenotiek augļa segu izstumšana no dzemdes. Fizioloģiski tas notiek 6–8 stundu laikā pēc otrs dzemdību stadijas (augļa izstumšanas no dzemdes un dzemdību ceļiem). Viedokļi dalās par to, kāds ir laika periods, kad var uzskatīt, ka ir augļa segu aizture – viens viedoklis ir, ja augļa segas nav atdalījušās 8–12 stundu laikā pēc teļa piedzimšanas, bet otrs viedoklis – ja tās nav atdalījušās 24 stundas. Tomēr šobrīd zinātnieki vienojās par to, ja augļa segas nav atdalījušās 12–24 stundu laikā pēc augļa izstumšanas, tad ir augļa segu aizture (Drillich *et al.*, 2006; Hashem & Amer, 2008; Beagley *et al.*, 2010; Islam *et al.*, 2013).

Augļa segu aizture (ASA) slaucamo govju ganāmpulkā var būt 5–10% gadījumu (LeBlank, 2008), bet dažkārt pat līdz 15% gadījumu (Gilbert, 2016). Faktori, kas ietekmē augļa segu atdalīšanos vai neatdalīšanos, ir daudz: iedzīmība, ēdināšana, imunoloģiskie un patoloģiskie faktori. Visi ASA cēloņi un predisponējošie faktori pilnībā nav skaidri, bet viens no svarīgākajiem cēloņiem ASA ir saistīts ar strukturālām izmaiņām katelidonos un izmaiņām hormonālajos procesos (Djuricic *et al.*, 2011). ASA ietekmē ir kavēta dzemdes involūcija, un var izveidoties metrīts, endometrīts, kas tālāk var izraisīt augļības problēmas (Gröhn & Rajala-Schultz, 2000; Maizon *et al.*, 2004). ASA iespaidā dzīvniekiem samazinās ne tikai piena izslaukums, bet arī izpaliek pirmā meklēšanās, pagarinās starpatnešanās periods un rodas papildu izmaksas, to ārstējot (Kankofer, 1996), kā arī var iestāties neauglība (Tucho & Ahmed, 2017).

Jau daudzus gadus pastāv strīdīgi viedokļi par ASA ārstēšanas metodēm, kura ir pareizāka, labāka, ekonomiskāka un efektīvāka. Svarīgi ir izvēlēties efektīvāko ārstēšanas metodi govīm ar ASA. Pie ASA ir aprakstītas daudz un dažādas ārstēšanas iespējas ar relatīvu efektivitāti. Iegūtie rezultāti dažādām zinātnieku grupām ir pretrunīgi vai pat ar negatīvu ietekmi uz turpmāko govju reprodukciju (Frazer, 2005; Drillich *et al.*, 2007). Visvairāk pretrunu ir par manuālo augļa segu atdalīšanu (Peters & Laven, 1996; Stevens & Dinsmore, 1997; Drillich *et al.*, 2006, 2007). Tomēr par intrauterīno vai sistēmisko antibiotiku ievadīšanu un prostaglandīnu vai estradiolu lietošanu pie ASA pretrunu ir mazāk (Drillich *et al.*, 2006, 2007). Izvēloties ASA ārstēšanas metodi, svarīgi ir izvērtēt arī, kā šī ārstēšanas metode ietekmēs dzīvnieka turpmāko laktāciju (t.i. piena izslaukumu un somatisko šūnu skaitu (SŠS)).

Promocijas darba mērķis bija noskaidrot Latvijas apstākļiem ekonomiski izdevīgāko un piemērotāko augļa segu aiztures ārstēšanas metodi, kas rezultātā labvēlīgi ietekmē turpmāko govju laktāciju un reprodukciju.

Promocijas darba uzdevumi

1. Izvērtēt dzemdes involūciju, izmantojot rektālo un ultrasonogrāfisko izmeklēšanu, kā arī noskaidrot olnīcu funkcionālo stāvokli ar rektālo, ultrasonogrāfisko pārbaudi un dzemdes imūnhistokīmisko izmeklēšanas metodi govīm bez augļa segu aiztures un ar to;
2. Izpētīt asins morfoloģiskos un bioķīmiskos rādītājus, kā arī progesterona līmeņa dinamiku asins serumā govīm bez augļa segu aiztures un ar to;
3. Izanalizēt dzemdes dobuma bakteriālo mikrofloru govīm bez augļa segu aiztures un ar to;
4. Izvērtēt dzemdes gлотādas histoloģisko ainu 42. dienā pēc atnešanās govīm bez augļa segu aiztures un ar to, izmantojot histoloģiskās un imūnhistoloģiskās metodes;
5. Izanalizēt dažādu augļa segu aiztures ārstēšanas metožu ietekmi uz turpmāko laktāciju, izmantojot izslaukuma un somatisko šūnu skaita rādītājus;
6. Izvērtēt dažādu ārstēšanas metožu efektivitāti govīm ar augļa segu aizturi, izmantojot reprodukciju raksturojošos rādītājus;
7. Aprēķināt dažādo augļa segu aiztures ārstēšanas metožu ekonomiskās izmaksas.

Darba zinātniskā novitātē

1. Pirmo reizi Latvijā iegūti oriģināli dati Holšteinas melnraibās šķirnes govīm par dažādu augļa segu aiztures ārstēšanas metožu ietekmi uz govju izslaukumu un somatisko šūnu skaitu turpmākajā laktācijā un reprodukciju.
2. Iegūti oriģināli dati Holšteinas melnraibās šķirnes govīm par dažādo augļa segu ārstēšanas metožu ietekmi uz somatisko šūnu skaitu turpmākajā laktācijā.
3. Vienkopus izvērtēti un iegūti oriģināli dati Holšteinas melnraibās šķirnes govīm par dzemdes involūciju un olnīcu ciklisko aktivitāti, asins morfoloģiskiem, bioķīmiskiem rādītājiem, dzemdes dobuma satura mikrobioloģiskiem izmeklējumiem un dzemdes gлотādas biopsijas histoloģiskiem un imūnhistoloģiskiem izmeklējumiem pēcdzemdību periodā kopumā starp dažādām augļa segu aiztures ārstēšanas metodēm.

PĒTĪJUMU REZULTĀTU APROBĀCIJA

Pētījuma rezultāti aprobēti sekojošās zinātniskās konferencēs:

1. Skuja, S., Antāne, V. Progesterona līmeņa un reprodukcijas rādītāju salīdzinājums slaucamajām govīm ar un bez augļa segu aiztures. Dzīvnieki. Veselība. Pārtikas higiēna: konference "Veterinārmedicīnas zinātnes un prakses aktualitātes", Jelgava, 2012. gada 22.-23.novembrī / Latvijas Lauksaimniecības universitāte. Veterinārmedicīnas fakultāte. Jelgava: LLU. Prezentēšana mutiski.
2. Skuja, S., Antāne, V. *Postpartum serum biochemical and haematological changes in cows with and without retained fetal membranes. Research for rural development 2010 : annual 16th international scientific conference, Jelgava, 19-21 May 2010 / Latvia University of Agriculture*. Jelgava: LLU. Prezentēšana mutiski.
3. Skuja, S., Antāne, V. *The ovary activity in cows with and without retained fetal membranes*. Dzīvnieki. Veselība. Pārtikas higiēna: starptautiskā zinātniskā konference, Jelgava, 2010. gada 29. oktobrī / Latvijas Lauksaimniecības universitāte. Veterinārmedicīnas fakultāte. Jelgava: LLU. Prezentēšana mutiski.
4. Skuja, S., Antāne, V. Dzemdes bakterioloģisko, histoloģisko un reprodukcijas rādītāju salīdzinājums govīm ar un bez augļa segu aiztures. Dzīvnieki. Veselība. Pārtikas higiēna: starptautiskā zinātniskā konference. Jelgava, 2008. gada 14. novembrī. Latvijas Lauksaimniecības universitāte. Veterinārmedicīnas fakultāte. Jelgava: LLU. Prezentēšana mutiski.
5. Skuja, S., Antāne, V. *Concentration of progesterone in the blood serum in cows with and without retained fetal membranes. 8th International Ruminant reproduction symposium: Anchorage, Alaska, September 3-7, 2010. Anchorage*. Stenda referāts.
6. Skuja, S., Antāne, V., Feldmane, L. *Bacteriological and histological studies of cow's uterus without and with retained fetal membranes. 16th International congress on animal reproduction; (2008). 2008, July, 13–18, Budapest, Hungary*. Stenda referāts.
7. Skuja, S., Antāne, V. *Bacteriological and morphological studies of cow's uterus with and without retained fetal membranes. 14th International conference on production diseases in farm animals (ICPD): Ghent, Belgium, 20-24 June 2010 / Ghent University. Ghent, 2010*. Stenda referāts.

Darba apjoms: Promocijas darbs noformēts uz 120 lappusēm un sastāv no ievada, literatūras apskata, darba metodikas, pētījuma rezultātiem, diskusijas, 8 secinājumiem, 3 ieteikumiem praksei, 270 izmantotās literatūras avotiem un 3 pielikumiem. Darbā iekļautas 15 tabulas un 32 attēli.

MATERIĀLS UN METODES

MATERIĀLA RAKSTUROJUMS

Pētījums veikts laikā no 2007. gada septembra līdz 2009. gada janvārim.

Pētījumā izmantotas 60 dažāda vecuma (divi līdz astoņi gadus vecas) Holšteinas melnraibās šķirnes govis no Dobeles novada saimniecības "A" ganāmpulka ar 650 slaucamām govīm un no Jelgavas novada saimniecības "B" ganāmpulka ar 300 slaucamām govīm. Pētījuma laikā vidējais izslaukums standartlaktācijā pirmajā saimniecībā bija 7968.94 ± 36.30 kg, bet somatisko ūnu skaits (SSS) – 228.63 ± 9.49 tūkst.ml⁻¹. Attiecīgi otrajā saimniecībā govju vidējais izslaukums standartlaktācijā bija 6447.70 ± 60.41 kg, bet SSS – 193.57 ± 10.59 tūkst.ml⁻¹. Dzīvniekus ēdināja atbilstoši slaucamo govju barības devu normatīviem. Abās fermās dzīvnieku turēšana, kopšana un ēdināšana bija līdzīga – govis slauca un baroja divas reizes dienā un ūdens bija brīvi pieejams.

Govīm otrajā dienā pēc atnešanās tika arī noteikta ķermeņa kondīcija 5 balļu jeb punktu sistēmā pēc Mulvany (1977) ķermeņa kondīcijas vērtēšanas sistēmas (kur balle 1 ir ļoti vāja govs, bet balle 5 - resna, aptaukojusies). Pētījuma govju grupas tika veidotas ievērojot grupu homogenitātes principu. Vēlamā ķermeņa kondīcija pēc dzemdībām ir no 2.5 līdz 3.7 ballēm, vecākām govīm pielaujama no 3.5 līdz 4.0 ballēm. Mūsu pētījumā kontroles grupas govīm vidējā barojuma pakāpe bija 3.7 ± 0.04 balles, tāpat kā govīm ar ASA – 3.7 ± 0.02 balles. Nevienam no pētījuma dzīvniekiem barojuma pakāpe nebija zem 3.0 ballēm, un tikai dažiem dzīvniekiem tā bija 4.0 balles.

Pētījuma govis iedalīja 4. grupās. Pētījuma govju sadalījums pa grupām atspoguļots 1. tabulā. Pirmā govju grupa bija kontroles grupa - klīniski veselas govis bez ASA. Otrs, trešās un ceturtās grupas govis bija klīniski veselas, bet ar ASA. Otrs un trešās grupas govīm dzemdes dobumā ievadīja 3 antibakteriālās tabletēs – *Gynobiotic* (neomicīna sulfāts 350000 SV, oksitetraciklīna hidrohlorīds 500 mg). Otrajā grupā iedalīja govis, kam aizturētās augļu segas, mēģinot atdalīt pirmos trīs karunkulus, tie viegli atdalījās un aizturētās augļa segas varēja atdalīt piecu līdz astoņu minūšu laikā. Trešajā grupā iedalīja govis, kam aizturētās augļa segas, mēģinot tās atdalīt no pirmajiem trīs karunkuliem, neatdalījās. Ceturtajā grupā iedalīja govis, kam bija augļa segu aizture un kas bija ļoti aktīvas ar labu ēstgribu. Būtiskas atšķirības starp govju grupu vidējo vecumu, laktācijas kārtas skaitli un izslaukumu nebija.

1. tabula/Table 1

**Govju iedalīšanas kritēriji pētījuma grupās apzinātas grupēšanas laikā un
govju grupu vidējais vecums, laktācija un izslaukums/
Allocation criteria for cows into the study groups during the deliberate
grouping. Average age, lactation and milk yield of groups of cows**

Govju grupas vidējais izslaukums, kg/ <i>Average milk yield of a group of cows, kg</i>	Govju grupas vidējais laktācijas skaitis/ <i>Average lactation of a group of cows</i>	Govju grupas vidējais vecums, gadi/ <i>Average age of the cow group, years</i>	Dzemdē ievadīja antibakteriālās tabletēs/ <i>Antibacterial tablets were given into the uterus</i>	ASA atdalīja manuāli/ <i>RFM removed manually</i>	Augļa segas atdalījās 24h PP/ <i>Fetal membranes expulsion during 24 h PP</i>	Govju grupa/ <i>Group of cows</i>
8010.40±728.23	2.13±0.32	3.3±0.4	-----	JĀ/YES	1. n=15	
7441.60±822.20	3.40±0.49	4.7±0.5	-----	JĀ/YES	2. n=15	
6426.20±728.15	2.33±0.37	3.5±0.4	-----	JĀ/YES	3. n=15	
7557.26±1004.60	3.00±0.46	4.1±0.5	-----	NĒ/NO	4. n=15	

PP - post partum

Ja govīm ķermeņa temperatūra bija $\geq 39.5^{\circ}\text{C}$, tad izvērtēja, vai dzīvniekam ir nepieciešama vispārējā ārstēšana vai nav. Ja tām ķermeņa temperatūra bija $\geq 39.5^{\circ}\text{C}$, bet ēstgriba vēl bija saglabājusies, tad veica dzīvnieka vispārējo ārstēšanu ar ceftiofūra hidrohlorīdu (1.1 mg/kg zemādā 1 reizi dienā 3 dienas pēc kārtas). Turpretī tad, ja dzīvnieks neēda, bija apātisks, vairāk gulēja un ķermeņa temperatūra $> 39.5^{\circ}\text{C}$, izmantoja 10 mg/kg prokaīna benzilpenicilīna injekcijas muskulī 5 dienas pēc kārtas vienu reizi dienā. Kontroles grupā tādas bija 2 govis, kur viena bija ārstēta ar prokaīna benzilpenicilīnu un otra – ar ceftiofūra hidrohlorīdu. Otrajā govju grupā viena govs ārstēta ar prokaīna benzilpenicilīnu. Trešajā govju grupā 3 govis ārstētas ar ceftiofūra hidrohlorīdu, bet 4. govju grupā 3 govis ārstētas ar prokaīna benzilpenicilīnu un 3 govis – ar ceftiofūra hidrohlorīdu.

Katrā grupā daļai govju 8. un 21. dienā pēc dzemdībām injicēja sintētisko PGF_{2α} – kloprostenolu (nātrijs sāls veidā) 500 µg/dzīvniekam vienā injekcijas reizē, lai pārbaudītu, vai tas veicina labāku olnīcu darbību, dzemdes involūciju, samazina dzemdes iekaisuma iespējamību un uzlabo grūsnības rezultātus. Kontroles grupā astoņas govis saņēma PFG_{2α} injekciju, 2. govju

grupā – piecas govis, 3. govju grupā – 10 dzīvnieki, un 4. govju grupā tās bija sešas govis, kas saņēma PFG_{2a} injekciju. Govis, kurām injicēt PFG_{2a}, noteica saimniecību veterinārsti (vadoties pēc dzīvnieka stāvokļa telpā un uzvedības, kā arī pēc ķermēja temperatūras).

Cietstāves perioda ilgums pētījuma govīm

Cietstāves perioda (CP) ietekme uz augļa segu aizturi govīm tika noteikta *post factum*. Cietstāves perioda dienu skaits katram pētījumā iesaistītajam dzīvniekam pēc atnešanās tika iegūts no valsts aģentūras "Lauksaimniecības datu centra" (LDC) (www.ldc.gov.lv) datiem. Cietstāves periodu iedalījām: saīsinātais CP (n=9), kur cietstāves laiks bija līdz 46 dienām, tradicionālais CP (n=15), kur cietstāves laiks bija no 47 līdz 70 dienām, un pagarinātais CP (n=9), kur cietstāves laiks bija virs 70 dienām. Kopumā pētījumā iesaistītie dzīvnieki bija 60, no kuriem 42 bija govis un 18 – teles. Tā kā telēm nav cietstāves perioda, tad šajā sadaļā izvērtējām tikai govis – kontroles grupā deviņas govis, bet govju grupās ar ASA – 33 govis.

Izslaukums un piena somatisko šūnu skaits pētījuma govīm

Pētījumā iesaistītajām govīm piena izslaukuma un somatisko šūnu skaita (SŠS) rādītāji tekošajai un iepriekšējai laktācijai tika iegūti no LDC par 2006., 2007., 2008. un 2009. gadu. Abi rādītāji tika vērtēti pirmajās 30 dienās PP, pirmajās 100 dienās PP un standartlaktācijā (305 dienu laktācijā).

Aprēķinos par ASA ārstēšanas metožu ietekmi uz piena izslaukumu un SŠS bija ieķļauti 42 dzīvnieki (daudzreiz dzemdējušās govis, kam bija vismaz divas laktācijas). ASA ārstēšanas metožu ietekmi uz piena izslaukumu un SŠS varam novērtēt, ja zinām iepriekšējās laktācijas piena izslaukumu un SŠS. Starpība piena izslaukumam un SŠS tika aprēķināta, no pašreizējās laktācijas atņemot iepriekšējo laktāciju. Par optimālu SŠS slieksni pieņemām 200 tūkst. ml⁻¹, pamatojoties uz daudzu zinātnieku pētījumiem (DeGraves & Fetrow, 1993; Harmon, 1994; Hillerton, 1999; Madousse *et al.*, 2008; Lusis *et al.*, 2010; Petzer *et al.*, 2017; Lusis *et al.*, 2019). Pirms statistiskās salīdzināšanas visi somatisko šūnu skaita dati tika pārveidoti logaritmiskās $[\log_2 (S\dot{S} \times 10^{-5}) + 3]$ vienībās (LSŠS). Laktācijas vidējais LSŠS bija katra mēneša somatisko šūnu testa dienas vidējais aritmētiskais no 7. līdz 305. dienai PP.

Lai analizētu govju izslaukuma un SŠS rādītājus, svarīgi ir zināt saimniecību ražošanas izmaksas un samaksu par piena kilogramu. Pētījuma laikā ganāmpulkos vidēji, lai saražotu 1 kilogramu piena, ražošanas izmaksas

bija 0.24 eiro, bet piena iepirkuma cena vidēji bija 0.27 eiro. Līdz ar to par katru neiegūto piena kilogramu kopējais zaudējums bija 0.51 eiro.

Reprodukcijas rādītāji pētījuma govīm

Pētījumā iesaistītajām govīm analizēti sekojoši reprodukcijas rādītāji: intervāls no atnešanās līdz pirmajai māksligajai apsēklošanas reizei, apsēklotās govīs līdz 100 dienām PP, apsēklošanas indekss, grūsno govju procents no pirmās apsēklošanas reizes, grūsnās govīs līdz 150 dienām PP, grūsnās govīs līdz 200 dienām PP, govju bezgrūsnības periods un izbrāķētās govīs. Lai šos rādītājus varētu precīzi aprēķināt, tad māksligās apsēklošanas reižu skaits katram dzīvniekam; bezgrūsnības periods; nākamā atnešanās un dzīvnieku izbrāķēšanas dati tika iegūti no LDC datiem (2007.–2010.gads).

PĒTĪJUMA GAITAS APRAKSTS

Govīs, kuras izmantoja pētījumā, tika reģistrētas; novērtēts vispārējais veselības stāvoklis pēc klīniskās izmeklēšanas shēmas (Kelly, 1984; Jemeljanovs *et al.*, 2007), kas ietver dzīvnieka identifikāciju, izturēšanos, pozu, un ķermeņa temperatūras noteikšanu. Tika veikta arī dzimumorgānu rektālā un ultrasonogrāfiskā izmeklēšana, asiņu noņemšana morfoloģiskai un bioķīmiskai analīžu veikšanai, mikrobioloģiskā izmeklēšana dzemdes dobuma saturam, kā arī noņemti endometrija biopsijas paraugi histoloģiskai, imūnhistokīmiskai izmeklēšanai. Pētījuma gaita atspoguļota 2.tabulā.

2.tabula/*Table 2*

**Veikto izmeklējumu grafiks pētījuma govīm/
Schedule of examinations performed for study cows**

Veiktie izmeklējumi/ <i>Examinations performed</i>	42. diena /Day 42 PP	32. diena /Day 32 PP	30. diena /Day 30 PP	28. diena /Day 28 PP	26. diena /Day 26 PP	24. diena /Day 24 PP	22. diena /Day 22 PP	18. diena /Day 18 PP	16. diena /Day 16 PP	14. diena /Day 14 PP	6. diena /Day 6 PP	4. diena /Day 4 PP	2. diena /Day 2 PP
Klīniskā izmeklēšana/ <i>clinical examination</i>	X	X	X	X									

2.tabulas nobeigums/*End of Table 2*

Veiktie izmeklējumi/ <i>Examinations performed</i>	42. diena /Day 42 PP	X										
	32. diena /Day 32 PP											
	30. diena /Day 30 PP											
	28. diena /Day 28 PP											
	26. diena /Day 26 PP											
	24. diena /Day 24 PP											
	22. diena /Day 22 PP	X										
Rektālā dzemdes un olnīcu izmeklēšana/ <i>Rectal examination of the uterus and ovaries</i>			X									X
Ultrasonogrāfiskā dzemdes un olnīcu izmeklēšana/ <i>Ultrasonographic examination of the uterus and ovaries</i>			X			X			X			X
Asiņu morfoloģiskā izmeklēšana ($n=240$)/ <i>Morphological examination of blood (n=240)</i>	X		X			X			X			
Asiņu bioķīmiskā izmeklēšana ($n=60$)/ <i>Blood biochemical examination (n=60)</i>	X											
Progesterona līmeņa noteikšana asins serumā ($n=780$)/ <i>Determination of blood serum progesterone levels (n=780)</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Dzemdes dobuma mikrobioloģiskā izmeklēšana ($n=180$)/ <i>Microbiological examination of the uterine cavity (n=180)</i>	X				X							X
Antimikrobiālās rezistences noteikšana ($n=180$)/ <i>Detection of antimicrobial resistance</i>												
Dzemdes glotādas biopsiju paraugu izmeklēšana histoloģiski un imūnhistoloģiski ($n=60$)/ <i>Examination of uterine endometrium biopsy samples histologically and immunohistologically (n=60)</i>												X

Datu analīze veikta, par pamatu ņemot govju grupu sadalījumu (kontroles grupas govvis ar fizioloģisku pēcdzemdības periodu un govvis ar augļa segu aizturi).

Dzīvnieku kliniskā izmeklēšana bija veikta pēc Kelly (1984) un Jemeljanovs *et al.* (2007) ieteiktajām metodēm, rektāli dzemdi izmeklēja pēc Könyves *et al.* (2009), bet olnīcas pēc Senger (2003) ieteiktām vadlīnijām, ultrasonogrāfiski dzemdi izmeklēja pēc Kask *et al.* (1999) un olnīcas pēc Senger (2003) ieteiktām vadlīnijām, asiņu morfoloģiskā, bioķīmiskā un progesterona līmeņa izmeklēšana veikta pēc LVS EN ISO 15189:2007 standarta prasībām, mikrobioloģiskā izmeklēšana dzemdes dobuma saturam veikta pēc standartmetodēm: LVS ISO 7218:1996 un LVS NE ISO 6887-1:1999, kā arī LVS NE ISO 4833:2003 un Quinn *et al.*, 1994, antimikrobiālās rezistences pārbaudi veica ar disku difūzijas metodi pēc CLSI M31 standartiem, bet histoloģisko paraugu izmeklēšana veikta pēc Kask & Gustafson (1998), Rhyaf (2010), Pascottini & Opsomer (2016) un imūnhistoķīmisko paraugu izmeklēšana veikta pēc Pascottini *et al.* (2016), Martin *et al.* (2008), Ohta *et al.* (2013) ieteiktajām vadlīnijām.

PĒTĪJUMĀ IZMANTOTO METOŽU APRAKSTS

Vispārejā un speciālā kliniskā izmeklēšana

Pētījumā iesaistītajām govīm reģistrēja piedzimušā teļa dzimumu, dzīvs vai nedzīvs pēcnācējs, to skaits. Tāpat tika pierakstīts govs vecums un laktācija. Pēc 48 stundām, 4, 6, 14, 16, 18, 22, 24, 26, 28, 30, 32 un 42 dienām pēc dzemdībām tika veikta govs **kliniskā izmeklēšana** – novērtēts tās stāvoklis telpā, izmērīta ķermeņa temperatūra ar medicīnisko dzīvsudraba termometru (Ningbo Huahui, Ķīna), kā arī izvērtēts **izdalījumu raksturs no dzimumorgāniem** pēc Kask *et al.* (1999) ieteiktās metodikas: 0 – nav izdalījumu; 1 – izdalās dzidras glotas; 2 – glotās nelieli balti piemaisījumi vai tās ir duļķainas; 3 – izdalījumi biezi, balti, strutaini; 4 – izdalījumi biezi, brūni sarkani strutaini; 5 – izdalījumi šķidri, smirdīgi, ar strutu gabaliņiem (Kask *et al.*, 1999).

Rektāli izmeklējot dzemdi, izmantojot Könyves *et al.* (2009) ieteiktās vadlīnijas, noteikts dzemdes tonuss (ja nereagē uz rektālo masāžu – atoniska; ja nedaudz reagē – vājš tonuss; ja labi savelkas – labs tonuss), un lielums (liela dzemde – ar plaukstu nav iespējams to apņemt, atrodas vēdera dobumā, dažkārt tajā ir patoloģisks šķidrums; vidēji liela dzemde – dzemde nedaudz palielināta, var apņemt ar roku, basketbola bumbas lielumā; nedaudz ieslīd vēdera dobumā un pēc taustes atgādina mīklainu masu; maza dzemde – dzemdi var apņemt ar sauju; dzīvniekam meklējoties, dzemde saraujas), kas ļauj noteikt un prognozēt turpmāko dzimumorgānu veselības stāvokli. Sākot ar sesto dienu pēc

dzemdībām, **rektāli izmeklēja olnīcas**, nosakot to aktivitāti (folikuli, dzeltenie ķermeņi).

Ultrasonogrāfija govīm bez augļa segu aiztures un ar to

Govju dzimumorgānu ultrasonogrāfiskajai izmeklēšanai tika izmantots portatīvais “Tringa Linear Vet” ultrasonogrāfs (“ESAOTEPie Medical”, Itālija). Dzimumorgānu ultrasonogrāfija tika veikta 5 MHz frekvencē 14., 22., 28., un 42. dienā *post partum* (PP) vienlaikus ar rektālo izmeklēšanu. **Izmeklējot dzemdi**, tajā fiksētais saturs tika grupēts pēc tā daudzuma dzemdē pēc Kask *et al.* (1999) ieteiktās metodikas: 0 – nav šķidruma (nav konstatētas neehogēnās zonas dzemdē); A – minimāls šķidruma (nelielas, nenozīmīgas neehogēniskās zonas fiksētas); B – neliels šķidruma daudzums dzemdē (10–20 ml); C – vidējs šķidruma daudzums dzemdē (neehogēnās zonas ir vērojamas pusē dzemdes); D – liels šķidruma daudzums dzemdē (gandrīz visā dzemdē ir vērojamas neehogēnās zonas) (Kask *et al.*, 1999).

Veicot ultrasonogrāfiju **olnīcām**, tās tika iedalītas aktīvās un neaktīvās. Neaktīvām olnīcām konstatējām, ka tās ir ovālas, mazas, gludas, ar daudz antrāliem (terciālajiem) folikuliem. Turpretī aktīvām olnīcām konstatēja folikulus vai dzelteno ķermenī dažādās attīstības stadijās (Senger 2003).

Asins morfoloģiskā un bioķīmiskā izmeklēšana govīm bez augļa segu aiztures un ar to

Asins paraugus hematoloģiskai izmeklēšanai no govīm ieguva 2., 14., 22., 28. dienā PP. Asins paraugi noņemti no astes vēnas, izmantojot 3 ml sterilos vienreizējās lietošanas vakuumteinera stobriņus ar K3E 7.5% 0.072 ml antikoagulantu. Paraugi izmeklēti akreditētā laboratorijā SIA “Centrālā laboratorija” (reg. Nr. 215/L430-C). Analīžu izpilde atbilst LVS EN ISO 15189:2007 standarta prasībām.

Bioķīmisko parametru noteikšanai asins serumā 48 stundas pēc dzemdībām tika izmantoti 7 ml sterilie vienreizējās lietošanas vakuumteinera stobriņi bez antikoagulanta. Turpretī glutationa peroksidāzes paraugu noteikšanai izmantoja 7 ml sterilos vienreizējās lietošanas vakuumteinera stobriņus ar heparīnu kā antikoagulantu.

Asiņu paraugus **progesterona līmeņa noteikšanai** ieguva 48 stundas, 4., 6., 14., 16., 18., 22., 24., 26., 28., 30., 32. un 42. dienā pēc dzemdībām. Paraugs noņēma no astes vēnas 7 ml sterilos vienreizējās lietošanas vakuumteinera stobriņos bez antikoagulanta, kurus tālāk dažu stundu laikā nogādāja un izmeklēja akreditētā laboratorijā SIA “Centrālā laboratorija”.

Par pamatu pieļaujamām fizioloģiskajām asins bioķīmisko un morfoloģisko rādītāju vērtībām izmantoti pieejamie publicētie dati (Pasquini & Pasquini, 1996; Meyer & Harvey, 2004; Kahn & Line, 2005).

Mikrobioloģisko paraugu iegūšana no dzemdes un to izmeklēšana govīm bez augļa segu aiztures un ar to

Dzemdes dobuma satura mikrobioloģiskajai izmeklēšanai paredzētos 180 paraugus ieguva no govīm bez augļa segu aiztures un ar to 2., 14. un 42. dienā pēc atnešanās. Paraugu noņemšanai tika izmantoti sterilie "Equi-Vet" ("Kruuse", Dānija) dzemdes bakterioloģiskie tamponi. Pēc paraugu iegūšanas tos dažu stundu laikā +4 °C temperatūrā nogādāja Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskajā institūtā "BIOR". Izmeklējumi tika veikti saskaņā ar Klīniskās Veterinārās Mikrobioloģijas Quinn *et al.* (1994) vadlīnijām un pēc vispārpriņemtām akreditētām standartmetodēm: LVS ISO 7218:1996 un LVS NE ISO 6887-1:1999, kā arī LVS NE ISO 4833:2003. Bakterioloģiskiem paraugiem veica antimikrobiālās rezistences (AMR) noteikšanu. Šim nolūkam izmantoja CLSI M31 (neietilpst LATAK akreditācijas sfērā) klīnisko laboratorijas standartu.

No dzemdes dobuma iegūtajiem paraugiem, vispirms ieguva mikroorganismu polikultūru un tad fīrkultūras. Stafilocoku pārstāvju izolēšanai un identificēšanai no dzemdes dobuma satura, lietotas šādas barotnes: Bairda – Parkera agars (Olu dzeltenuma telurīta glicīna piruvāta agars (*Biolife*, Spānija) (koagulāzes pozitīvie stafilocoki (*Staphylococcus aureus* un citi)); Smadzeņus irsfids infūzijas buljons (*OXOID*, UK); Mannitola sāļu agars (*Becton Dickinson*, US); Barojošais agars ar 5% aitas asins piedevu.

Gram pozitīvās mikrofloras noteikšanai (*Corynebacterium spp.*, *Aerococcus urinae*, *Streptococcus spp.*), dzemdes dobuma satura paraugi uzsēti uz barojošā agara ar 5% aitas asins piedevu, paraugi inkubēti $37\pm1.0^{\circ}\text{C}$ temperatūrā 48 stundas, bakterioloģiskos uzsējumus pārbaudīja pēc 24 stundām. Mikroorganismi līdz sugai noteikti, izmantojot *BBL Crystal* (US) Gram pozitīvo mikroorganismu identifikācijas sistēmu. Tajā iekļauti vairāku substrātu fermentācijas, 33 oksidācijas un hidrolīzes testi. Identifikācija tika veikta arī pamatojoties uz kolonijas morfoloģiju, mikroskopiju un fenotipiskajām īpašībām.

Enterobacteriaceae dzimtas pārstāvji jeb Gram negatīvā mikroflora (*Klebsiella spp.*, *Escherichia coli* un *Proteus spp.*) noteikti, izmantojot selektīvās barotnes: MacConkey agars (*Difco BBL*); Laktozes TTC agars (*SIFIN*, Vācija). Uzsējumi inkubēti $37\pm1.0^{\circ}\text{C}$ temperatūrā 48 stundas, bakterioloģiskos uzsējumus pārbaudīja pēc 24 stundām. Mikroorganismi līdz sugai noteikti, izmantojot *BBL Crystal* (US) Gram negatīvo mikroorganismu identifikācijas sistēmu. Tajā iekļauti 33 oksidācijas, hidrolīzes testi un vairāku

substrātu fermentācijas. Baktērijas identificejām, salīdzinot iegūtos reakciju rezultātus ar datu bāzē esošajiem.

Anaerobo mikroorganismu (*Clostridium spp.*) izolēšanai izmantoja DRCM selektīvo barotni (ang. *Differential Reinforced Clostridium Medium, Scharlau Microbiology*). Anaerobo vidi nodrošināja ar 1 ml sterīlu vazelīnēļļu, ko pārlēja barotnei pa virsu. To visu inkubēja $37\pm1.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūrā 96 stundas.

Baktēriju izolātiem veica antimikrobiālās rezistences (AMR) pārbaudi 2., 14. un 42. dienā PP ar disku difūzijas metodi (Kirby-Bauer metode) (Hudzicki, 2016). Rezultātus izvērtēja pēc medikamentu iedarbības interpretācijas tabulas. Pētījumā iegūtajiem bakterioloģiskiem paraugiem laboratorijā, veicot AMR, izmantoja: kloksacilīnu 500 µg (“Bio-Rad”, Francija) (pret beta laktamāzi rezistento penicilīnu grupa), ceftriaksone 30 µg (“Bio-Rad”, Francija) (trešās paaudzes cefalosporīns, no ceaflosporīnu grupas), neomicīnu 30 IV (“Bio-Rad”, Francija) un streptomicīnu 10 µg (“Bio-Rad”, Francija) (aminoglikozīdu grupa), amoksicilīnu 25 µg (“Bio-Rad”, Francija) (penicilīnu grupa), teraciklīnu 30 µg (“Bio-Rad”, Francija) (tetraciklīnu grupa), sulfametoksazolu/ trimetoprimu 1.25/23.75 µg (“Bio-Rad”, Francija) (sulfamīdu antibiotikas), rifampīnu 5 µg (“Bio-Rad”, Francija) (rifamicīnu grupa), penicilīnu 6 µg (“Bio-Rad”, Francija) (penicilīnu grupa).

Dzemdes biopsiju histoloģiskā izmeklēšana

Pētījumā iesaistītajām govīm 42. dienā pēc dzemdībām veica dzemdes dobuma biopsiju ar oriģinālu biopsijas instrumentu (“Divisible biopsy instrument” 60 cm, “Kruuse”, Dānija). Pētījuma laikā iegūti 60 biopsijas paraugi, kuriem tika veikta histoloģiskā izmeklēšana. Biopsijas paraugs tika noņemts no resnākā dzemdes raga dorsālās sienas ventrālās virsmas. Paraugu ieguva no dzemdes endometrija. Iegūtos audu paraugus nekavējoties ievietoja neitrālā 10% formalīna šķīdumā, pH 7.5 (Humason, 1967). Tie tika nogādāti P. Stradiņa Klīniskās universitātes slimnīcas Patoloģijas institūta laboratorijā, kur veica to tālāko histoloģisko sagatavošanu un izmeklēšanu.

Histoloģiskajos izmeklējumos dzemdes gļotāda tika vērtēta pēc patoloģisko procesu izmaiņām. Pēc Rhyaf (2010), Pascottini & Opsomer (2016), Velladurai *et al.* (2017), Alagar *et al.* (2018) ieteiktām vadlīnijām audu patoloģisko procesu mēs izvērtējām pēc sekojošiem kritērijiem: 1) dzemdes gļotādā epitēlija virsmas atslānošanās, 2) submukozā sīko asinsvadu pilnasīnība, 3) subepiteliālā slānī neutrofilo leikocītu, limfocītu un plazmocītu infiltrācija, 4) atsevišķu dziedzeru lūmenā deskvamētas epitēlija šūnas un 5) hemosiderīna ieslēgumi (Rhyaf, 2010; Pascottini & Opsomer, 2016; Velladurai *et al.*, 2017; Alagar *et al.*, 2018).

Papildus jau minētajai histoloģisko preparātu dzemdes gлотādas novērtēšanai vērā tika ņemta arī leikocītu infiltrācija, ko novērtēja 400 reižu palielinājumā. Ja piecos reprezentatīvos brīvi izvēlētos redzes laukos, kuru laukums bija vidēji $71404 \pm 79.06 \text{ } \mu\text{m}^2$, konstatēja 0–29 leikocītu, tad to uzskatīja par normālu dzemdes gлотādu līdz vieglam iekaisumam. Ja bija 30–80 iekaisuma šūnas, tas tika dēvēts par vidēji smagu iekaisumu, bet, ja vairāk nekā 80 iekaisumu šūnu, tad to kvalificēja kā smagu dzemdes gлотādas iekaisumu (Kask & Gustafson, 1998).

Dzemdes biopsiju imūnhistokīmiskā izmeklēšana

Imūnhistokīmiskā izmeklēšana tikai veikta, lai iegūtu informāciju, vai dzīvnieki uz biopsijas ņemšanas laiku estrus ciklā bija folikulārā vai luteālā fāzē. Pascottini *et al.* (2016) apraksta, ka priekšmeklēšanās (*proestrus*) periodā un pēcmeklēšanās (*metestrus*) periodā dzemdes gлотādā infiltrējas liels daudzums polimorfonukleāro šūnu, kas ir normāls fizioloģisks process – atbildes reakcija uz dominējošiem hormoniem. To ir svarīgi zināt, kad tiek interpretēti histoloģiskie rezultāti par subklīnisko endometrītu. Kopā ar histoloģiskā parauga sagatavošanu tika sagatavots paraugs arī imūnhistokīmiskai izmeklēšanai. Imūnhistokīmiskai izmeklēšanai tika iegūti $3 \mu\text{m}$ biezi dzemdes gлотādas griezumi un sagatavoti tālākai izmeklēšanai. Sagatavošanas procesā izmantoja šādas primārās antivielas: anti – estrogēna receptora alfa (monoklonāla peles antivieļa pret cilvēka antigēnu MMAH, klons 1D5, kods N 1575, atšķaidījums 1:1); anti – progesterona receptors (monoklonāla peles antivieļa pret cilvēka antigēnu MMAH, klons 1A6, kods N 1595, atšķaidījums 1:1); anti – CD3 nosaka T šūnas (T limfocītus), tārīgā poliklonāla truša antivieļa pret cilvēka antigēnu, kods A 0452, klons – poliklons, atšķaidījums 1:100. Saistītās primārās antivielas vizualizācijai saskaņā ar ražotāja protokolu tika izmantota LSAB2 vizualizācijas sistēma, kas ietvēra biotinilētu sekundāru antivieļu un streptavidīnu kompleksu ar peroksidāzi, un 3,3 – diaminobenzidīnu. Pretkrāsojums tika nodrošināts ar hematoksilīnu trīs minūtes. Pēc skalošanas mikropreparāti tika dehidratēti, segti ar segstikliņu. Visos etapos izmantotas adekvātas pozitīvās un negatīvās kontrolreakcijas. Pozitīvās struktūras nokrāsojās brūnā krāsā.

Estrogēna un progesterona ekspresija tika vērtēta dzemdes gлотādas segepitēlijā, dziedzeru epitēlijā un stromas šūnu kodolos. Estrogēno receptoru α un progesterona receptoru koncentrācija dzemdes stromā visaugstākā ir *estrus* laikā (0. un 5. diena) un *metestrus* laikā, bet zemākā – *diestrus* un *proestrus* laikā. Turpretī dzemdes dziedzeru epitēlijā visaugstākā estrogēno receptoru α koncentrācija ir 0., 5., 9. un 13. dienā meklēšanās ciklā, bet progesterona receptoru koncentrācija visaugstākā ir 0., 5. un 9. meklēšanās cikla dienā (Martin *et al.*, 2008). CD3 $^{+}$ pozitīvā ekspresija govju meklēšanās ciklā būtiski

vairāk ir *stratum compactum* slānī. Šī CD3⁺ pozitīvā ekspresija augstāka ir meklēšanās cikla agrīnā un vidējā luteālā fāzē, bet mazāk – folikulārajā fāzē (Ohta *et al.*, 2013).

Imūnhistoķīmiskajos izmeklējumos pozitīvo struktūru (estrogēno receptoru α un progesterona receptoru) relatīvais daudzums vērtēts ar puskvantitatīvo skaitīšanas metodi pēc Pilmanes *et al.* (1998). Pozitīvo struktūru intensitāte noteikta, izmantojot šādu gradāciju: (-) nav pozitīvo struktūru redzeslaukā; (+) nedaudz pozitīvas struktūras redzeslaukā; (++) vidējs daudzums pozitīvo struktūru redzeslaukā; (+++) daudz pozitīvo struktūru redzeslaukā; (++++) ļoti daudz pozitīvo struktūru redzeslaukā (Pilmane *et al.*, 1998).

Datu statistiskajā apstrādē puskvantitatīvajā metodē iegūtie rezultāti apstrādāti kā ordinālās skalas dati. Kopā imūnhistoķīmiskai izmeklēšanai tika sagatavoti un analizēti 56 audu preparāti, 4 iegūtajos biopsijas paraugos nebija pietiek;oši materiāls, ko analizēt.

CD3⁺ pozitīvo struktūru intensitāte noteikta, izmantojot Ohta *et al.* (2013) ieteikto metodi - novērtēja 200 reižu palielinājumā vismaz trijos reprezentatīvos brīvi izvēlētos redzes laukos, kuru laukums bija $0.1 \mu\text{m}^2$ (saskaitīti un izrēķināts vidējais CD3⁺ pozitīvo T šūnu skaits $0.1 \mu\text{m}^2$ laukumā). Ja dzemdes gлотādas paraugos vidēji konstatēja 0–29 limfocītu (difuzi dzemdes gлотādas stromā un dzemdes gлотādas sedzošajā epitelijā), tad to uzskatīja par normālu fizioloģisku procesu, bet ja bija 30 un vairāk limfocītu, tad tas tika dēvēts par iekaisumu.

EKONOMISKO IZMAKSU APRĒĶINS

Piena ražošana un labi govju reprodukcijas rādītāji ir vissvarīgākie piena lopkopībā, un tie ir svarīgi ekonomiskās dzīvotspējas veicinātāji (Mahnani *et al.*, 2021). **Faktiskie ekonomiskie zaudējumi** (FEZ), izteikti naudas izteiksmē, rodas dzīvnieku saslimšanas, nobeigšanās, nokaušanas rezultātā (Brūveris, 1987), pazeminātas produktivitātes un reprodukcijas rezultātā (Brūveris, 1987; Mahnani *et al.*, 2021), kā arī neiegūstot jaunpiedzimušos (Brūveris, 1987). Ekonomiskajos aprēķinos vadījāmies pēc Brūvera (1987) ieteiktajām formulām:

Faktiskos ekonomiskos zaudējumus dzīvnieku **pies piedu likvidēšanas gadījumā** aprēķināts pēc formulas:

$$FEZ = A \cdot Sv \cdot C - N$$

A - pies piedu nokauto dzīvnieku skaits;

Sv - viena dzīvnieka vidējā dzīvmasa, kg;

C - 1 kg dzīvmasas iepirkuma cena, eiro;

N - naudas ieņēmumi no realizētās produkcijas, eiro (Brūveris, 1987).

Faktiskos ekonomiskos zaudējumus, **samazinoties dzīvnieku produktivitātei** pēc pārslimošanas, aprēķina (produkcijas zaudējuma koeficents):

$$FEZ = PZK \cdot A \cdot C$$

PZK - produkcijas zaudējumu koeficents;

A - slimīgo dzīvnieku skaits;

C - 1 kg dzīvmasas iepirkuma cena, eiro (Brūveris, 1987).

Faktiskie ekonomiskie zaudējumi, **salīdzinot produktivitāti slimajiem un veselajiem dzīvniekiem vienā ganāmpulkā**

$$FEZ = (P_1 - P_2) \cdot A \cdot L \cdot C$$

P_1 - veselo dzīvnieku vidējā produktivitāte diennaktī, kg;

P_2 - slimīgo dzīvnieku vidējā produktivitāte diennaktī slimīšanas periodā, kg;

A - pārslimojošo dzīvnieku skaits;

L - slimīšanas dienu skaits;

C - 1 kg iepirkuma cena, eiro (Brūveris, 1987).

Faktiskie ekonomiskie zaudējumi, **neiegūstot jaundzimušos** govju slimīšanas gadījumos:

$$FEZ = A \cdot V$$

A - nedzimušo teļu skaits;

V - viena jaundzimušā teļa vērtība, eiro (Brūveris, 1987).

Piena šķirnes govju **jaundzimušā teļa vērtību** (TV) aprēķina:

$$TV = 3.61 \cdot C$$

3.61 - piena daudzums centneros (cnt), kas ekvivalenti jaunpiedzimušā teļa nepieciešamajam barības daudzumam priekš tā attīstības;

C - 1 cnt piena ar bāzes tauku saturu iepirkuma cenai, eiro (Brūveris, 1987).

Lai aprēķinātu **kopējos ekonomiskos zaudējumus**, tad Brūveris (1987) iesaka faktiskajām ekonomiskajām izmaksām klāt pieskaitīt vēl veterinārās izmaksas, ko sastāda ārstnieciskie pasākumi, atveselošanas pasākumi un profilaktiskie pasākumi.

DATU STATISKĀ APSTRĀDE

Datu statistikai apstrādei tika lietota "MS Excel" aprakstošā statistika (vidējie rādītāji un standartķūda). Neparametriskā ANOVA metode **Kraskela-Vollisa tests** tika izmantots, lai pētījuma govīm analizētu ķermeņa temperatūru, asiņu morfoloģiskos rādītājus 14., 22. un 28. dienā PP, progesteronu rādītājus,

dienu skaitu no atnešanās līdz pirmajai mākslīgās apsēklošanas (MA) reizei, apsēklošanas indeksu, bezgrūsnības perioda ilgumu. Ja tests parādīja būtiskas atšķirības starp grupām, tad tālāk tika izmantots **Manna-Vitnija tests**, lai konstatētu starp kurām grupām ir šī būtiskā atšķirība.

Pēcnācēju salīdzinošajam vērtējumam, atnešanās laika izvērtēšanai, dzemdes involūcijas un konstatētā šķidruma daudzumu tajā novērtēšanai, neaktīvo olnīcu procentuālā skaita izvērtēšanai; mikroorganismu procentuālā skaita izvērtēšanai starp 2., 14. un 42. dienu PP; dzemdes iekaisuma un subklīniskā endometrīta smaguma pakāpes izvērtēšanā, apsēkloto govju procentuālā skaita un grūsno govju procentuālā skaita izvērtēšanai no pirmās MA reizes, grūsno govju procentuālam izvērtējumam līdz 100 no 200 dienām PP, izmantoja **z-testu**, lai salīdzinātu 2 paraugu proporcijas.

Savukārt **t-Testu**: 2 paraugkopām ar atšķirīgu izkliedi izmantoja: grūsnības ilguma izvērtēšanai; cietstāves ilguma izvērtēšanai; vecuma un laktācijas kārtas skaitļa izvērtēšanai un biokīmisko, kā arī hematoloģisko rādītāju analīzei 48 h PP.

Lai novērtētu ASA ārstēšanas ietekmi uz piena izslaukumu un SŠS 30, 100 un 305 dienās PP, tika izmantota programmatūra **“Stata IC” 12.1** (“StataCorp LP”, 4905 Lakeway Drive, College Station TX77845, ASV, “Stata IC” 12.1 versija “Windows”), **lineārā daudzfaktoru regresija** (daudzfaktoru analīzes metode). Starpības starp pašreizējiem un iepriekšējiem izslaukumiem un SŠS 30, 100 un 305 dienās PP tika analizētas, izmantojot **rangu zīmju testu pāru salīdzināšanai ar Villkoksona kritēriju**. Visi efekti tika koriģēti, ņemot vērā ganāmpulka ietekmi. Atšķirības par būtiskām tika uzskaņitas, ja $p < 0.05$ (Arhipova & Bāliņa, 2003; Teibe, 2007; Krastiņš & Ciemīņa 2003), (<http://epitools.ausvet.com.au/content.php?page=StatisticsHome>).

PĒTĪJUMA REZULTĀTI UN DISKUSIJA

Govs dzemdes un olnīcu rektālās un ultrasonogrāfiskās izmeklēšanas rezultāti

Visām pētījumā iesaistītajām govīm rektāli un ultrasonogrāfiski veicām dzemdes un olnīcu izmeklēšanu. Izmeklējot govju dzemdes ultrasonogrāfiski 14., 22., 28. un 42. dienā PP, paralēli govju dzemdes izmēru samazinājumam arī šķidruma daudzums tajās samazinājās. Mūsu pētījumā kontroles grupas govīm (1. govju grupai) pilnīga dzemdes involūcija un dzemdes gлотādas regenerācija bija vērojama 28. dienā PP (rektāli izmeklējot, dzemde maza, un ultrasonogrāfiski dzemdes dobumā nav konstatētas neehogēnās zonas). Turpretī govīm ar ASA šāda aina pilnībā bija vērojama tikai pēc 42. dienas PP. Daži autori uzkata, ja dzemē vairs nav vērojums šķidruma, tad dzemdes gлотāda ir atjaunojusies, un vidēji tas notiek 31–36 dienās PP (Rao Chalapati & Rao

Ramamohana, 1980; Prasad & Krishna, 2009), vai arī no 26 līdz 52 dienām PP (Noakes *et al.*, 2001; Drillich *et al.*, 2005; LeBlanc, 2008).

Ir dažadi viedokļi, kad atsākas olnīcu cikliskā aktivitāte govīm pēc atnešanās. Mūsu pētījumā olnīcu cikliskā aktivitāte gan kontroles grupas govīm, gan govīm ar ASA atsākās ap 18. un 22. dienu PP. Literatūrā ir minētas 17 dienas PP (Saiduddin *et al.*, 1967); vai 30–33 dienas PP (Buch, Tyler & Casida, 1955; Morrow, Roberts, & McEntee, 1969) vai pat tikai ap 76. dienu PP (Morrow, 1986; Elmetwally, 2018). Tucho un Ahmed (2017) norāda, ka ASA kavē normālu olnīcu cikliskās aktivitātes atsākšanos, kaut gan mūsu pētījumā šis apgalvojums neapstiprinājās. Arī Bekana, Jonsson un Kindahl (1996; 1997) savos pētījumos ir konstatējuši, ka ASA un tam sekojošais endometrīts nebija par cēloni kavētai olnīcu aktivitātei, kas sakrīt ar mūsu pētījumu.

Katrā grupā daļai govju 8. un 21. dienā pēc dzemdībām injicēja sintētisko PGF_{2α} – kloprostenolu (nātrijs sāls veidā) 500 µg/dzīvniekam vienā injekcijas reizē, lai pārbaudītu, vai tas veicina labāku olnīcu darbību, dzemdes involūciju, samazina dzemdes iekaisuma iespējamību un uzlabo grūsnības iestāšanos. Starp govīm, kuras 8. un 21. dienā PP saņēma PGF_{2α} injekciju, un govīm, kurām to nepielietoja, statistiski būtiskas atšķirības dzemdes lieluma ziņā nenovēroja ($p>0.05$). Arī Hirsbrunner *et al.* (2006) apraksta, ka, injicējot PGF_{2α} divas reizes, būtiskas atšķirības starp grupām, kam deva un nedeva PGF_{2α}, nenovēroja. Lai gan daži autori norāda, ka lietojot PGF_{2α} injekcijas pēc atnešanās agrā PP periodā, tas uzlabo dzemdes miometrija kontrakcijas, un dzemde straujāk samazinās apjomā (Hirsbrunner, 2003; Melendez *et al.*, 2004). Szenci (2016) apraksta, ka *in vitro* pētījumos konstatēja, ka ASA govju placentomos tika saražots mazāk PGF_{2α} un vairāk prostaglandīna E (PGE) nekā govīm bez ASA. Līdz ar to, injicējot PGF_{2α} vienu stundu pēc atnešanās un tad 12 h PP, varētu panākt, ka augļa segas atdalās īsā laikā un uzlabo dabiskos dzemdes aizsardzības mehānismus. Villeneuve *et al.* (1988) norāda, ka pēc PGF_{2α} injekcijas olnīcu cikliskā aktivitāte atsākas ātrāk. Šis apgalvojums mūsu pētījumā neapstiprinājās – starp govīm, kam bija un nebija injicēts PGF_{2α}, būtiskas atšķirības nenovēroja.

Asiņu morfoloģisko un bioķīmisko rādītāju rezultāti govīm bez augļa segu aiztures un ar to

Asiņu morfoloģiskos un bioķīmiskos rādītājus salīdzinājām starp govīm, kurām augļa sega atdalījās 24 stundu laikā pēc dzemdībām (kontroles grupa), un govīm ar augļa segu aizturi. Hematoloģiskās analīzes tika iegūtas otrajā dienā, 14., 24. un 28. dienā PP, bet bioķīmiskās analīzes – otrajā dienā PP. Asiņu morfoloģiskie rādītāji govīm bez un ar augļa segu aizturi otrajā dienā pēc dzemdībām parādīti 3.tabulā.

Hematoloģiskie rādītāji govīm bez un ar augla segu aizturi otrajā dienā pēc dzemdiņām/

Blood morphological parameters in cows with and without retained fetal membranes on the second day postpartum

Rādītāji/ Parameters	Kontroles grupas govīs/ Control group	Govis ar ASA/ Cows with RFM	Norma/ Standard
Leikocīti, ($\times 10^9/\text{L}$)/ <i>White blood cells, ($\times 10^9/\text{L}$)</i>	$13.94\pm1.59^*$	$9.09\pm0.76^*$	$4\text{--}12^1$
Eritrocīti, ($\times 10^{12}\text{g/L}$)/ <i>Erythrocytes, ($\times 10^{12}\text{g/L}$)</i>	6.34 ± 0.18	6.55 ± 0.08	$5\text{--}10^1$
Hemoglobīns, ($\text{x}10\text{g/L}$)/ <i>Hemoglobin, ($\text{x}10\text{g/L}$)</i>	10.86 ± 0.22	10.68 ± 0.13	$8\text{--}15^1$
Hemotokrīts, ($\text{x}10^{-2}\text{L/L}$)/ <i>Hemotocrit, ($\text{x}10^{-2}\text{L/L}$)</i>	30.88 ± 0.57	30.83 ± 0.39	$24\text{--}46^1$
Vidējais eritrocītu izmērs (fl)/ <i>Average erythrocyte size, (fl)</i>	49.10 ± 1.05	47.08 ± 0.51	$40\text{--}60^1$
Vidējais hemoglobīna saturs, (pg)/ <i>Average hemoglobin content, (pg)</i>	17.26 ± 0.36	16.49 ± 0.45	$11\text{--}17^1$
Vidējā hemoglobīna koncentrācija, ($\text{x}10\text{g/L}$)/ <i>Average hemoglobin content, ($\text{x}10\text{g/L}$)</i>	35.21 ± 0.35	34.73 ± 0.08	$30\text{--}36^1$
Trombočīti, ($\text{x}10^9/\text{L}$)/ <i>Platelets, ($\text{x}10^9/\text{L}$)</i>	$231.88\pm19.37^*$	$302.52\pm3.61^*$	$100\text{--}800^2$
Stabīņkodolainie leikocīti, ($\text{x}10^9/\text{L}$)/ <i>Band neutrophils, ($\text{x}10^9/\text{L}$)</i>	0.70 ± 0.12	0.68 ± 0.14	$0\text{--}0.12^1$
Segmnetkodolainie leikocīti, ($\text{x}10^9/\text{L}$)/ <i>Mature neutrophils, ($\text{x}10^9/\text{L}$)</i>	$7.81\pm1.13^*$	$3.65\pm0.35^*$	$0.60\text{--}4.00^1$
Eozinofilie leikocīti, ($\text{x}10^9/\text{L}$)/ <i>Eosinophils, ($\text{x}10^9/\text{L}$)</i>	$0.31\pm0.06^*$	$0.14\pm0.01^*$	$0\text{--}2.40^1$
Bazofilie leikocīti, ($\text{x}10^9/\text{L}$)/ <i>Basophils, ($\text{x}10^9/\text{L}$)</i>	0.16 ± 0.02	0.10 ± 0.02	$0\text{--}0.20^1$
Limfocīti, ($\text{x}10^9/\text{L}$)/ <i>Lymphocytes, ($\text{x}10^9/\text{L}$)</i>	4.35 ± 0.47	3.76 ± 0.27	$2.35\text{--}7.50^1$
Monocīti, ($\text{x}10^9/\text{L}$)/ <i>Monocytes, ($\text{x}10^9/\text{L}$)</i>	$1.52\pm 0.21^*$	$0.82\pm0.18^*$	$0.025\text{--}0.85^1$

* $p<0.05$

¹ Kahn M.C. and Line S. (2005), *The Merck Veterinary Manual*, ninth edition., Merial & Co., INC., Whitehouse Station, NJ., USA, pp.2712

² Pasquini P.C. and Pasquini S. (1996), *Guide to Bovine Clinics*, 3rd Edition, SUDZ publishing, Pilot Point, Tx, USA, pp. 309

Analizējot hematoloģiskos rādītājus govīm otrajā dienā pēc dzemdiņām, redzam, ka kontroles grupas govīm bija paaugstināts leikocītu skaits

(13.94 ± 1.59 ($\times 10^9/L$)) uz segmentkodolaino leikocītu rēķina (7.81 ± 1.13 ($\times 10^9/L$)), bet govīm ar ASA leikocīti bija fizioloģisko normu robežas – 9.09 ± 0.76 ($\times 10^9/L$) ($p < 0.05$). Arī monocītu skaits būtiski pārsniedza fizioloģiskās normas robežas kontroles grupas govīm (1.52 ± 0.21 ($\times 10^9/L$)), un bija būtiski vairāk nekā govīm ar ASA (0.82 ± 0.18 ($\times 10^9/L$)) ($p < 0.05$).

Normālas dzemdības dzīvniekam izraisa stresu, kā rezultātā leikocītu skaits būtiski pieaug ar vieglu nobīdi pa kreisi (Jain, 1986), kas arī apstiprinās mūsu pētījumā kontroles grupas govīm. Tomēr govīm ar ASA mūsu pētījumā otrajā dienā PP konstatējām, ka leikocīti, eritrocīti, hemoglobīns un hemotokrīts bija fizioloģisko normu robežas, kaut gan tie pie normālām dzemdībām ir paaugstināti $12\text{--}24$ h PP, un tad samazinās tuvāko dienu laikā (Jain, 1986). Jain (1986). Stockham un Scott (2008) norāda, ka paaugstināts stabīkkodolaino leikocītu skaits govīm ar ASA ir atbildes reakcija uz akūtu iekaisumu. Kimura *et al.* (2002), Beagley *et al.* (2010) atklāj, ka govīm ar ASA neutrofilo leikocītu darbība jau pirms dzemdībām ir būtiski zemāka nekā govīm bez ASA, un tā ilgst 1–2 nedēļas vēl pēc dzemdībām, kas mūsu pētījumā arī apstiprinājās.

Ceturpdadsmitajā dienā pēc atnešanās govju grupās saglabājās leikocītu novirze pa kreisi, tātad paaugstinājās stabīkkodolaino leikocītu skaits, kam, salīdzinot ar otro pēcdzemību dienu, bija tendence samazināties. Divdesmit otrajā dienā pēc dzemdībām govīm saglabājās paaugstināts stabīkkodolaino leikocītu skaits (novirze pa kreisi), turklāt govīm ar ASA tas bija būtiski augstāks ($p < 0.05$). Arī 28. dienā PP govju grupās bija vēl saglabājusies leikocītu novirze pa kreisi, kaut gan minētie rādītāji turpināja normalizēties un tuvojās fizioloģiskās normas robežām.

Asinis bioķīmiskajā izmeklēšanā govīm ar ASA novēroja būtiski augstāku kopējā un tiešā bilirubīna daudzumu salīdzinājumā ar kontroles grupas govīm, kurām augļa segas atdalījās 24 stundu laikā ($p < 0.05$) (4.tabula).

4.tabula/Table 4

Bioķīmiskie rādītāji govīm bez un ar augļa segu aizturi
Biochemical parameters in cows without and with retention of fetal membranes

Rādītāji/ Parameters	Kontroles grupas govis/ Control group	Govis ar ASA/ Cows with RFM	Norma/ Standard
Kopējais bilirubīns, ($\mu\text{mol}/\text{L}$)/ Total bilirubin, ($\mu\text{mol}/\text{L}$)	$4.77 \pm 0.34^*$	$6.19 \pm 0.65^*$	$0.70\text{--}14.00^1$
Tiešais bilirubīns/ Direct reacting	$1.24 \pm 0.27^*$	$2.26 \pm 0.17^*$	$0\text{--}0.34^2$

4.tabulas nobeigums/*End of Table 4*

Rādītāji/ Parameters	Kontroles grupas goviš/ <i>Control group</i>	Goviš ar ASA/ <i>Cows with RFM</i>	Norma/ Standard
Netiešais bilirubīns/ <i>Indirect reacting</i>	3.54±0.36	4.06±0.45	0-8.55 ²
Holesterīns, (mmol/L)/ <i>Cholesterol</i> ,(mmol/L)	2.24±0.15	2.36±0.04	2.90-6.90 ³
Kopējais proteīns, (g/L)/ <i>Protein total</i> , (g/L)	66.38±1.18	69.19±1.89	62-82 ¹
Albumīns, (g/L)/ <i>Albumin</i> , (g/L)	29.43±0.65	29.70±0.25	28-39 ¹
Albumīna/globulīna attiecība/ <i>Albumin/globulin ratio</i>	0.81±0.04	0.78±0.02	0.84-0.94 ²
ASAT, (U/L)	118.9±9.38	109.80±9.70	45-110 ¹
Ca, (mmol/L)	2.10±0.08	2.10±0.04	2.10-2.80 ¹
P, (mmol/L)	1.70±0.16	1.60±0.18	1.40-2.50 ¹
Glutationa peroksidāze, (U/L)/ <i>Glutathione peroxidase</i> , (U/L)	36270.06±2269.53	34447.57±3499.46	

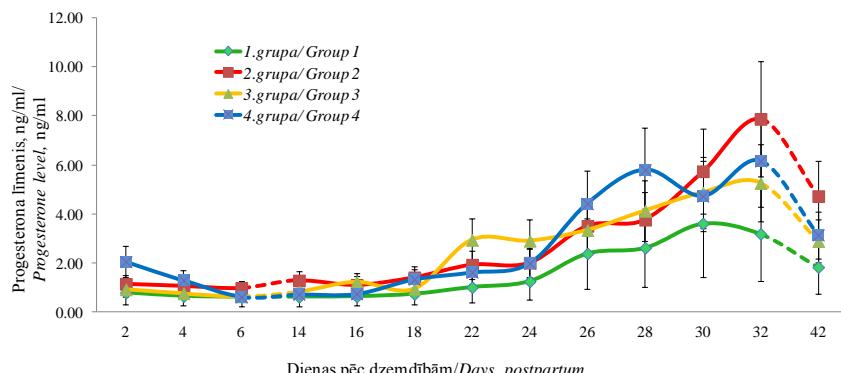
* p<0.05

¹ Kahn M.C. and Line S. (2005), *The Merck Veterinary Manual*, ninth edition., Merial & Co., INC., Whitehouse Station, NJ., USA, pp.2712² Pasquini P.C. and Pasquini S. (1996), *Guide to Bovine Clinics*, 3rd Edition, SUDZ publishing, Pilot Point, Tx, USA, pp. 309³ Cozzi G., Ravarotto L., Gottardo F., Stefani A. L., Contiero B., Moro L., Brscic M. & Dalvit P. (2011). Short communication: Reference values for blood parameters in Holstein dairy cows: Effects of parity, stage of lactation, and season of production. *J. Dairy Sci.* 94, pp. 3895–3901

Tas varētu liecināt par holeostātiskiem procesiem, kas norisinājās aknu šūnās, saistībā ar intrahepatiskiem žults noplūdes traucējumiem, ko varētu izraisīt aknu taukainā degenerācija. Arī holesterīna līmenis asinīs pētījuma goviš bija zem fizioloģiskās normas, kas norāda uz problēmām aknās (iespējama aknu taukainā degenerācija), kas apstiprinās Liepas (2000) pētījumos. Zemā albumīna/globulīna attiecība goviš ar ASA norāda uz iekaisuma procesiem organismā. Liepa (2000) norāda, ka albumīna/globulīna attiecība var arī

paaugstināties dažas dienas pirms, kā arī dažas dienas pēc atnešanās, jo iesaistās jaunpiena veidošanās procesā, bet var arī samazināties pie aknu slimībām, un akūtiem iekaisumiem.

Pēc dzemdībām noteiktās dienās (2., 4., 6., 14., 16., 18., 22., 24., 26., 28., 30., 32. un 42. dienā) bija noņemti asins paraugi, lai noteiktu progesterona līmeni asins serumā, kas tālāk sniedza informāciju par olnīcu funkcionālo stāvokli. Mūsu pētījumā pēc atnešanās visās govju grupās P_4 līmenis asinīs sāka paaugstināties ap 18. un 22. dienu (1.att.), kas norāda, ka olnīcās ovulācija ir notikusi apmēram 3 dienas iepriekš, kā to arī apraksta Kask *et al.* (1999).



1.att. Kopējais progesterona līmeņa vidējo rādītāju salīdzinājums pētījumā iekļautajām govju grupām

Nepārtrauktā līnija nozīmē, ka izmeklējumi bija veikti katru otro dienu, bet pārtrauktā līnija nozīmē, ka starp izmeklējumiem bija vairāk kā 2 dienas. 1. govju grupa – kontroles grupas govvis; 2. govju grupa – govvis ar ASA, kur tās atdala un dzīvniekus ārstē; 3. govju grupa – govvis ar ASA, kur tās neatdala un dzīvniekus ārstē; 4. govju grupa – govvis ar ASA, kur tās neatdala un dzīvniekus neārstē IU.

Fig. 1. Comparison of the mean progesterone levels for the study groups of cows

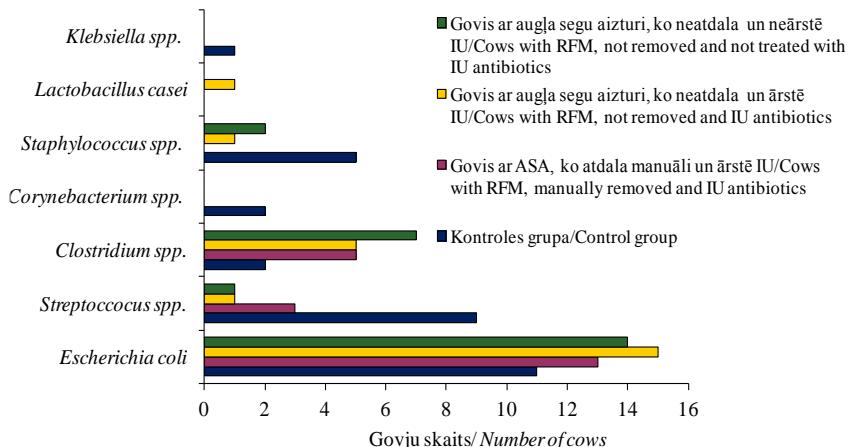
The solid line means that the checks were performed every other day, but the dashed line means that there were more than 2 days between examinations. Group 1 – control group; group 2 – cows with RFM, manually removed and IU antibiotics; group 3 – cows with RFM, not removed and IU antibiotics; group 4 – cows with RFM, not removed and not treated with intra uterine (IU) antibiotics.

Kaut gan statistiski būtiskas atšķirības asins serumā P_4 līmenim starp ASA grupu govīm pētījuma laikā nebija vērojamas ($p>0.05$), tomēr govīm ar ASA P_4 līmenis asins serumā bija augstāks nekā kontroles grupas govīm, ko savos pētījumos pamatā arī apstiprina Kaczmarowski *et al.* (2006) un Ali *et al.* (2009). Ali *et al.* (2009) pieļauj, ka palielinātais P_4 līmenis govīm ar ASA var būt saistīts ar placentas nespēju radīt specifiskus steroīdos enzīmus, kas palīdz

P₄ metabolismā un estrogēna veidošanā, kas savukārt var izraisīt imūnsupresīvu proteīnu uzkrāšanos dzemdes lūmenā un veidot dzemdi jutīgu pret infekcijām.

Dzemdes dobuma satura mikrobioloģisko izmeklējumu vērtējums govīm bez augļa segu aiztures un ar to

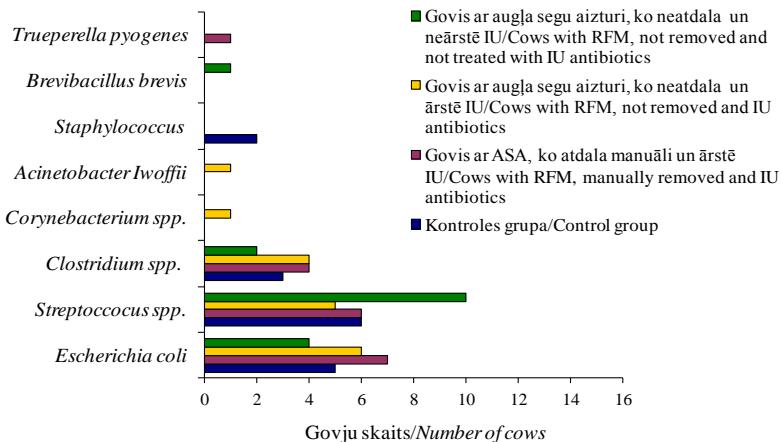
Dzemdes dobumā pēc atnešanās var būt gan aerobās un anaerobās, gan gram-pozitīvās un gram-negatīvās baktērijas. Mūsu pētījuma otrajā dienā PP 98% gadījumos govīm bija konstatēta dzemdes dobuma kontaminācija, bet 14. dienā PP tā bija 91% gadījumos. Tas sakrīt ar De Boer *et al.* (2014) pētījumiem, kur 90% gadījumu bija sastopama dažāda veida mikroorganismu kontaminācija dzemdes dobumā pirmajās divās nedēļās pēc govju dzemdībām, ko apraksta arī Knudsen *et al.* (2016). Knudsen *et al.* (2016) arī norāda, ka 8 nedēļu laikā pēc dzemdībām dzemdes dobums, pateicoties dzemdes involūcijai, kļūst atkal sterils. Šī tendence bija vērojama arī mūsu pētījumā (2., 3. un 4.att).



2.att. Izolētie mikroorganismi govīm no dzemdes dobuma 2.dienā pēc dzemdībām

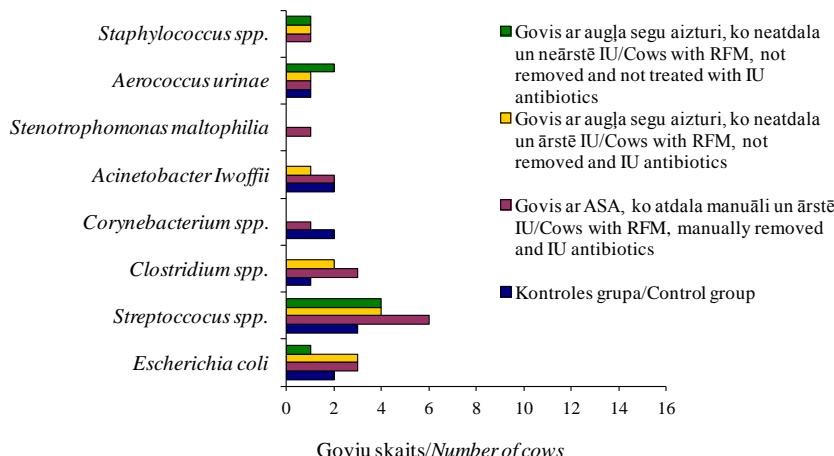
Fig. 2. Isolated microorganisms from the uterine cavity of cows on the 2nd day PP

Promocijas darba pētījumā baktērijas bija gan kā monokultūras, gan jaukta tipa kultūras veidā, kur fakultatīvi anaerobie mikroorganismu pārstāvji *Escherichia coli*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, aerobā baktērija *Corynebacterium spp.* un obligāti anaerobā baktērija *Clostridium spp.* bija konstatētas gan kontroles grupas govīm, gan govīm ar ASA.



3.att. Izolētie mikroorganismi gorīm no dzemdes dobuma 14.dienā pēc dzemdiņām

Fig. 3. Isolated microorganisms from the uterine cavity of cows on the 14th day PP



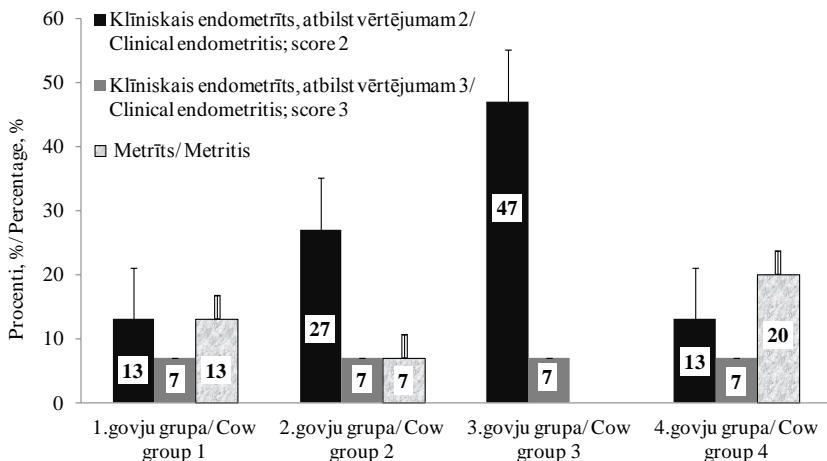
4.att. Izolētie mikroorganismi gorīm no dzemdes dobuma 42.dienā pēc dzemdiņām

Fig. 4. Isolated microorganisms from the uterine cavity of cows on the 42nd day PP

Jāpiezīmē, ka visbiežāk *E.coli* konstatēja 2. grupas gorīm (kur aizturētās augļa segas atdalīja manuāli un dzīvniekus ārstēja IU), kurām bija injicēts PGF2α. Tāpat 2. grupas gorīm 42. dienā PP konstatēja visvairāk no visām

govju grupām *Streptococcus spp.* un *Clostridia spp.* gadījumu skaitu. Literatūrā minēts, ka vairākos pētījumos biežāk satopamie mikroorganismi dzemdes dobumā bija fakultatīvi anaerobie patogēni *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes*, *Streptococcus spp.* (Bekana *et al.*, 1994; Huszenicza *et al.*, 1999; Sheldon *et al.*, 2006; Azawi, Rahawy & Hadad, 2008), *Staphylococcus spp.*, aerobās baktērijas *Bacillus spp.* un *Pseudomonas spp.*, kā arī obligāti anaerobās baktērijas *Fusobacterium necrophorum*, *Prevotella spp.*, *Bacteroides spp.* (Huszenicza *et al.*, 1999; Sheldon & Dobson, 2004; Azawi, Rahawy & Hadad, 2008; Moore *et al.*, 2019) un *Clostridium spp.* (Sheldon & Dobson, 2004).

Lielākajai daļai pētījuma govju pēc dzemdībām gan kontroles grupā, gan govīm ar ASA, dzemdes iekaisumi neizveidojās. Földi *et al.* (2006) savā rakstā apraksta, ka baktēriju klātbūtne PP govju dzemē (bakteriālais piesārņojums) ne vienmēr izraisa dzemdes iekaisumus vai klīnisku vispārēju saslimšanu. Tas ir atkarīgs no dzīvnieka imūnās sistēmas. Dzemdes involūciju var uzskatīt par "redzamo līdzsvaru", kur fizioloģiskie dzemdes pašaizsardzības mehānismi spēj neutralizēt bakteriālo piesārņojumu (Földi *et al.*, 2006).



5.att. Dzemdes iekaisumi pētījumā iesaistītajām govīm 14.dienā pēc atnešanās

1. govju grupa—kontroles grupas govīs; 2. govju grupa—govīs ar ASA, kur tās atdala un dzīvniekus ārstē; 3. govju grupa—govīs ar ASA, kur tās neatdala un dzīvniekus ārstē; 4. govju grupa—govīs ar ASA, kur tās neatdala un dzīvniekus neārstē IU.

Fig.5 Uterine inflammations of cows of study on day 14 after calving

Group 1 – control group; group 2 – cows with RFM, manually removed and IU antibiotics; group 3 – cows with RFM, not removed and IU antibiotics; group 4 – cows with RFM, not removed and not treated with IU antibiotics.

Mūsu pētījumā metrīts kontroles grupas govīm bija konstatēts 13% gadījumos (5.att), bet govīm ar augļa segu aizturi kopumā bija 14% gadījumos. Metrīta ārstēšanai izmantojām penicilīnu un ceftiofūru saturošas antibiotikas. Savukārt

31 endometrīts kontroles grupā bija konstatēts 13% gadījumos un govīm ar ASA kopumā 29% gadījumos. Turpretīm subklīniskais endometrīts kontroles grupas govīm bija 33% gadījumos, bet govīm ar ASA tas bija 42% gadījumos. Govis ar ASA ir vairāk pakļautas metrīta attīstības riskam 15–20% gadījumu (Callahan, 1987; Konyves 2009; Dubuc, 2011; Gilbert, 2018) un endometrīta attīstības riskam 5–92% gadījumu (Borsberry & Dobson, 1989; Van Werven, 1992; Brooks, 2000; Potter *et al.*, 2010; Sarder *et al.*, 2010; Gilbert, 2018) nekā citas govis. Kad metrīts ir diagnosticēts, tad vēlams laicīgi uzsākt sistēmisku antibiotiku terapiju. Biežāk izvēlas penicilīna vai ceftiofūra antibiotikas (Smith *et al.*, 1998) vai arī tetraciklīnu saturošas antibiotikas (Schmitt *et al.*, 2001), kuras ievada muskulū vai zemādā.

Veicot antimikrobiālo rezistenci pētījumā iegūtajiem paraugiem no govju dzemdes dobuma, tika noskaidrotas antibiotikas, kurām bija optimāla iedarbība, lai veiktu veiksmīgu dzīvnieku dzemdes dobuma (*intra uterine* (IU)) ārstēšanu. Tomēr atbildes no laboratorijas par rezultātiem bija iespējams iegūt ātrākais nepilnu divu nedēļu laikā no parauga nodošanas brīža. Līdz ar to tika pieņemts lēmums, ka IU terapijai izmantos neomicīna sulfātu 350000 SV kopā ar oksitetraciklīna hidrohlorīdu 500 mg. Nelielā koncentrācijā neomicīnam ir bakteriostatiska iedarbība (traucē olbaltumvielu sintēzi mikroorganismu šūnās), lielās devās – bakterīcīds efekts (bojā baktēriju šūnas citoplazmatiskās membrānas). Turpretī tetraciklīni darbojas uz baktēriju ribosomām, kur tie inhibē olbaltumvielu sintēzi. Tetraciklīni vairāk darbojas pret tiem mikroorganismiem, kas atrodas vairošanās fāzē (Purviņš, 1997). Kaut gan neomicīnam vajadzēja darboties pret lielāko daļu baktēriju, ko bijām izolējuši pētījuma laikā, tomēr tā nenotika. Antimikrobiālās rezistences rezultāti parādīja, ka tas bija jutīgs pret *E.coli*, *Staphylococcus spp.*, G grupas beta hemolītiskiem streptokokiem, *Corynebacterium spp.*, *Klebsiella spp.*, *Trueperella pyogenes*, bet parējos gadījumos neefektīvs. Turpretī tetraciklīns bija jutīgs vai daļēji jutīgs pret *Clostridium spp.*, *Staphylococcus spp.*, *E.coli*, *Streptococcus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Acinetobacter Iwoffii* un *Aerococcus urinae*.

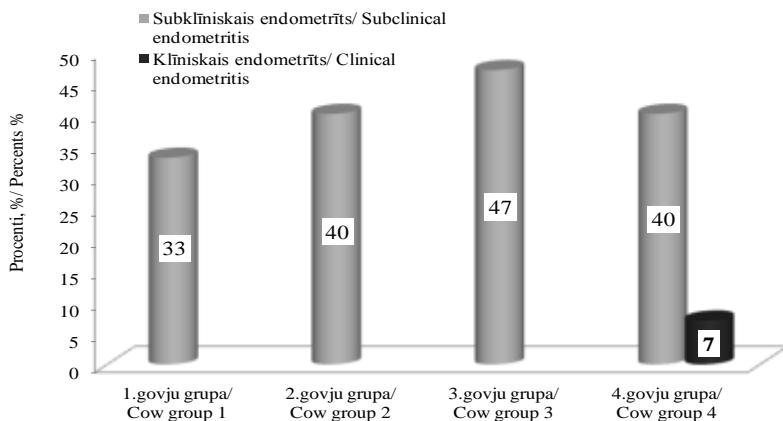
Histoloģiskie izmeklēšanas rezultāti govīm bez augļa segu aiztures un ar to

Dzemdes gлотādas paraugus ieguva 42. dienā pēc dzemdībām ar mērķi noskaidrot pētījumā iesaistīto govju dzemdes gлотādas stāvokli. Daļai govju ap 42. dienu PP dzemdes gлотāda vēl nebija 100% atjaunojies. Iekaisumu gadījumos un noteiktās meklēšanās cikla dienās (ko noteicām izmantojot imunohistokīmisko metodi) starp epitēlija šūnām atradām daudz neutrofilos leikocītus. Endometrija funkcionālā slāņa kompaktajā kārtā (subepiteliāli) starp šūnām bija mononukleāras šūnas un neutrofilie leikocīti, kas liecināja par hroniskā iekaisuma pazīmēm. Biopsijas paraugos, govīm ar ASA un bez tās, hronisko iekaisumu gadījumos tika konstatētas vienādās histoloģiskās atradnes

dažāda smaguma pakāpē. Dzemdes hronisku iekaisumu raksturoja eozinofilo leikocītu klātbūtne, biezas, sklerotiskas arteriolu sienas, saistaudu šūnu saviešanās un limfocitāro folikulu izveidošanās. Konstatējām arī lielperēķainus hroniskus iekaisumus dzemdes stromā ar tās fibrozo un asinsvadu savairošanos. Lielperēķainie hroniskie iekaisuma infiltrāti pārsvarā sastāvēja no limfocītiem un plazmocītiem ar eozinofilo leikocītu klātbūtni gлотādā. Bija vērojama arī perēķleida limfocītu infiltrācija. Dziedzeru gлотādu izklāja cilindriskais epitēlijs. To lūmenā atradām deskvamētu epitēliju un dažas iekaisuma šūnas. Veidojās it kā hiperplazētas dziedzeru grupas fibrozētā stromā ar hroniska iekaisuma šūnu grupiņām. Dažreiz histoloģiskajos paraugos tika konstatēti arī hemosiderīna ieslēgumi. Uz robežas ar dziedzeriem atradām dažus limfātiskus folikulu mononukleāru šūnu sakopojumus. Limfātiskiem folikuliem iezīmējās pat vairošanās centrs. Visas šīs hroniskā iekaisuma izmaiņas dzemdes gлотādā savos pētījumos ir konstatējuši arī Pascottini un Opsomer (2016), kā arī Rhyaf (2010).

Vidēji sešas nedēļas pēc dzemdībām, starp 34. un 47. dienu PP, dzemdē var attīstīties subklīniskais endometrīts (Thatcher *et al.*, 2006) un, kā atzīmē Opsomer (2015), subklīniskā endometrīta gadījumā neatrod endometrītam raksturīgās klīniskās pazīmes (purulenti vai mukopurulenti izdalījumi). Pascottini *et al.* (2016) pierādīja, ka lielāka iespēja un precīzāk noteikt subklīnisko endometrītu ir tad, ja veic dzemdes gлотādas histoloģiskos izmeklējumus. Tā ir jutīgāka metode nekā *in vivo* vai *ex vivo* citoloģija. Biopsijas paraugos visām mūsu pētījuma govīm ar hronisko iekaisumu tika konstatētas vienādas histoloģiskās atradnes, bet dažāda smagumā pakāpē: viegls un videji smags iekaisums. Šie iekaisumi bija subklīniskie endometrīti. Par subklīnisko endometrītu uzskatījām, ja klīniski nebija vērojamas dzemdes iekaisuma pazīmes, bet histoloģiski dzemdes subepiteliālā slānī bija hroniska iekaisuma infiltrāti – limfocīti un limfocitārie sakopojumi, makrofāgi, plazmocīti, eozinofilie leikocīti, atsevišķi apalīgi limfātiskie folikuli. Subepiteliālā slānī un stromā bija redzami arī hemosiderīna ieslēgumi.

Izmeklējumi parādīja, ka 40% otrās, 40% ceturtās un 47% trešās grupas govju endometrija histoloģiskā aina atbilda subklīniskam endometrītam, ko varam redzēt 6.attēlā.



6.att. Govju dzemdes iekaisumi 42.dienā pēc atnešanās

1. govju grupa—kontroles grupas govis; 2. govju grupa—govis ar ASA, kur tās atdala un dzīvniekus ārstē; 3. govju grupa—govis ar ASA, kur tās neatdala un dzīvniekus ārstē; 4. govju grupa—govis ar ASA, kur tās neatdala un dzīvniekus neārstē IU.

Fig.6. Inflammation of the uterus in the cows on the 42nd day after calving

Group 1 – control group; group 2 – cows with RFM, manually removed and IU antibiotics; group 3 – cows with RFM, not removed and IU antibiotics; group 4 – cows with RFM, not removed and not treated with IU antibiotics.

Histoloģiskās endometrija izmaiņas kontroles grupas govīm novēroja 33% gadījumu, kas būtiski atšķirās no ASA pētījuma govju grupu rezultātiem ($p<0.05$). Subklīniskajam endometrītam raksturīgs ir tas, ka samazinās grūsnības iestāšanās, pagarinās dienu skaits līdz pirmajai apsēklošanas reizei un pagarinās bezgrūsnības periods (Dubuc, 2011; Pascottini *et al.*, 2016).

Imūnhistoloģiskie rezultāti govīm bez augļa segu aiztures un ar to

Dzemde ir mērķorgāns olnīcu steroidiem hormoniem. Ar imūnhistoloģisko metodi dzemdes endometrijā noteicām estrogēnos receptorus alfa, progesterona receptorus un CD3⁺ receptorus uz T limfocītu virsmas 42. dienā PP. Katrs no šiem receptoriem norādīja, kurā meklēšanās cikla fāzē pētījuma dzīvnieks atradās (folikulārā vai luteālā fāzē). Šī informācija bija svarīga arī, lai precīzi varētu interpretēt histoloģiskos izmeklējumus, jo meklēšanās ciklā noteiktos laikos dzemdes endometrijā pastiprināti infiltrējas polimorfonukleārās šūnas.

Progesterona receptoru (PR), estrogēna receptoru (ER) alfa pozitīvā ekspresija dzemdes glotādās sedzošā epitelīja šūnu kodolos, dziedzeru epitelīju šūnu kodolos un stomas šūnās, izvērtējot pēc semikvantitatīvās metodes, bija

sastopama no ‘atsevišķām’ līdz ‘loti daudz’ pētījuma govīm. ER α un PR koncentrācija dzemdes stromā visaugstākā ir estrus cikla laikā (0. un 5. diena) un zemākā – luteālās fāzes laikā. Turpretī dzemdes dziedzeru epitēlijā visaugstākā ER α koncentrācija ir 0., 5., 9. un 13. dienā meklēšanās cikla laikā, bet PR koncentrācija visaugstākā ir 0., 5. un 9. dienā (Martin *et al.*, 2008). Turpretīm CD3⁺ pozitīvā ekspresija govju meklēšanās ciklā būtiski vairāk ir *stratum compactum* slānī. Šī CD3⁺ pozitīvā ekspresija augstāka ir meklēšanās cikla agrīnā un vidējā luteālā fāzē, bet mazāk – folikulārajā fāzē (Ohta *et al.*, 2013), kas arī apstiprinājās mūsu pētījumā. Tomēr izvērtējot pēc CD3⁺ pozitīvās ekspresijas, 47% govīm, kurām aizturētās augļa segas neatdala un dzīvniekus ārstē IU, tika konstatēta šī CD3⁺ pozitīvā ekspresija limfocitāro sakopojumu veidā vai arī bija vidēji vairāk kā 30 limfocīti uz $0.1 \mu\text{m}^2$ laukuma, kas norādīja uz subklīnisko endometrītu. Turpretīm pārējās govju grupās ar ASA, CD3⁺ pozitīvā ekspresija, kas norādīja uz subklīnisko endometrītu, bija mazāk (40% gadījumos).

Augļa segu aiztures ārstēšanas metožu ietekme uz turpmāko laktāciju

Analizējot ASA ārstēšanas dažādo metožu ietekmi uz turpmāko laktāciju, izmantojot izslauktā piena daudzumu un SŠS tajā, pirmajās 30 dienās PP būtisku atšķirību starp pētāmām govju grupām nenovēroja, ko savā pētījumā apstiprināja arī Drillich *et al.* (2007), tomēr ekonomiskajā ziņā bija vērojami lieli zaudējumi, kas redzami 5. tabulā.

Pētījuma laikā ganāmpulkos vidēji, lai saražotu 1 kilogramu piena, ražošanas izmaksas bija 0.24 eiro, bet piena iepirkuma cena vidēji bija 0.27 eiro. Līdz ar to par katru neiegūto piena kilogramu kopējais zaudējums bija 0.51 eiro. Salīdzinot katras vairākreiz dzemdējušās govs tagadējo laktāciju ar iepriekšējo laktāciju, un salīdzinot ASA govju grupas ar kontroles grupu (1. grupa), visvairāk neiegūtais piens bija 2. govju grupā, kur augļa segas atdala manuāli un dzīvniekus ārstē IU (attiecīgi 112.91 ± 91.86 kg) (5.tabula).

Bet pirmajās 100 dienās PP, salīdzinot katras vairākreiz dzemdējušās govs tagadējo laktāciju ar iepriekšējo laktāciju, un salīdzinot ASA govju grupas ar kontroles grupu (1. grupu), visvairāk neiegūtais piens bija no 2. grupas govīm (attiecīgi 372.98 ± 255.81 kg), kā arī no 4. grupas govīm (attiecīgi 239.75 ± 271.86 kg). Turpretī 3. govju grupā šī tendence bija vāji izteikta.

5.tabula/Table 5

Neiegūtais piens un ekonomiskie zaudējumi no govīm ar ASA attiecībā pret kontroles grupu pirmajās 30 dienās PP/

Milk yield decrease and economic losses in cows with retained fetal membranes during the first 30 days PP

Govs grupa/ Group of cows	Neiegūtais piens visai govju grupai, kg/ Milk yield decrease per cow, kg	Ekonomiskie zaudējumi vienai govijai, eiro/ Economic losses per cow, euro	Ekonomiskie zaudējumi visai govju grupai, eiro/ Economic losses per group, euro
1. grupa/ Group 1 (n = 9)	Kontrole*/ Reference category	Kontrole*/ Reference category	Kontrole*/ Reference category
2. grupa/ Group 2 (n = 13)	112.91	1467.83	57.58
3. grupa/ Group 3 (n = 8)	59.74	477.92	30.46
4. grupa/ Group 4 (n = 12)	68.73	824.76	35.05

* References kategorija

1. govju grupa—kontroles grupas govīs; 2. govju grupa—govīs ar ASA, kur tās atdala un dzīvniekus ārstē; 3. govju grupa—govīs ar ASA, kur tās neatdala un dzīvniekus ārstē; 4. govju grupa—govīs ar ASA, kur tās neatdala un dzīvniekus neārstē IU.

Group 1 – control group; group 2 – cows with RFM, manually removed and IU antibiotics; group 3 – cows with RFM, not removed and IU antibiotics, group 4 – cows with RFM, not removed and not treated with IU antibiotics.

Daži autori norāda, ka piena izslaukums turpmākajā laktācijā govīm ar ASA ir būtiski zemāks nekā veselajām govīm (Hossein-Zadeh & Ardalan, 2011; Islam *et al.*, 2012; Tucho & Ahmed, 2017). Tomēr Van Werven *et al.* (1992) norāda, ka tikai vairakkārt dzemdējušām govīm ASA būtiski samazināja piena izslaukumu laktācijā. Turpretīm Goshen un Shpigel (2006) savos pētījumos konstatēja, ka gan pirmspienēm, gan vairakkārt dzemdējušām govīm, kam bija ASA, standartlaktācijā pienu saražoja par 300–500 kg mazāk nekā pārējie ganāmpulka dzīvnieki. Vislielākie piena zaudējumi govīm ar ASA ir pirmajās 4 nedēļās PP (Lucey *et al.*, 1986)

Augla segu aiztures ārstēšanas metožu ietekme uz reprodukcijas rādītājiem govīm

Izvērtējot reprodukcijas rādītājus kopumā, iegūtie rezultāti nebija viennozīmīgi. Reprodukcijas rezultāti ir parādīti 6.tabulā

6.tabula/Table 6

Reprodukcijas rādītāji govīm bez un ar augļa segu aizturi/ Reproductive parameters in cows without and with retention of fetal membranes

Reprodukciiju raksturojošie lielumi/ <i>Reproductive parameters</i>	1.govju grupa/ <i>Group 1</i>	2. govju grupa/ <i>Group 2</i>	3. govju grupa/ <i>Group 3</i>	4. govju grupa/ <i>Group 4</i>
1. MA* reize pēc atnešanās (dienas)/ <i>Days open to the first service (days)</i>	83±9.5	94±12.9	120±15.2	104±9.1
Apsēklotās govīs līdz 100 dienām PP, % / <i>Inseminated cows up to 100 days PP, %</i>	73 ^{A,B}	64 ^{C,D}	43 ^{A,D}	31 ^{B,C}
Govju apsēklošanas indekss/ <i>Services per pregnancy</i>	3.63 ± 0.56	1.75 ± 0.37	2.25 ± 0.52	2.40±0.58
Grūsno govju % no 1.MA* reizes, % / <i>First service conception, %</i>	13 ^{A,B}	29 ^A	21 ^C	38 ^{B,C}
Grūsno govju % līdz 150 dienām PP, % / <i>Pregnant cows up to 150 days PP, %</i>	33	43 ^A	29 ^A	38
Grūsno govju % līdz 200 dienām PP, % / <i>Pregnant cows up to 200 days PP, %</i>	47	50	43	46
Govju bezgrūsnības periods (dienas)/ <i>Days open (days)</i>	166±24.38	126±18.08	148±19.05	160±25.03

6.tabulas nobeigums/*End of Table 6*

Reprodukciiju raksturojošie lielumi/ <i>Reproductive parameters</i>	1.govju grupa/ <i>Group 1</i>	2. govju grupa/ <i>Group 2</i>	3. govju grupa/ <i>Group 3</i>	4. govju grupa/ <i>Group 4</i>
Izbrāķētās govis, % / <i>Culled cows, %</i>	27 ^{A,B}	47 ^{A,C}	47 ^{B,D}	33 ^{C,D}

^{A,B,C,D} p<0.05

*MA - mākslīgā apsēklošana

1. govju grupa—kontroles grupas govis; 2. govju grupa—govis ar ASA, kur tās atdala un dzīvniekus ārstē; 3. govju grupa—govis ar ASA, kur tās neatdalā un dzīvniekus ārstē; 4. govju grupa—govis ar ASA, kur tās neatdalā un dzīvniekus neārstē IU.

Group 1 – control group; group 2 – cows with RFM, manually removed and IU antibiotics; group 3 – cows with RFM, not removed and IU antibiotics, group 4 – cows with RFM, not removed and not treated with IU antibiotics.

Lai gan no atnešanās līdz pirmajai mākslīgās apsēklošanas (MA) reizei starp 1. govju grupu (kontroles) un govīm ar ASA bija vērojamas atšķirības, tomēr tās nebija būtiskas ($p>0.05$). Patel *et al.* (2016) apraksta, ka manuāli atdalot aizturētās augļa segas, pagarinās laiks pa 20 dienām no atnešanās līdz pirmajai meklēšanās reizei, ja salīdzina ar citām ārstēšanas metodēm. Tādēļ, ka atdalot augļa segas manuāli, rodas nelielci bojājumi dzemdes gлотādā, kas savukārt samazina fagocitātes aktivitāti un neutrofilo leikocītu skaitu asinīs, līdz ar to samazinot lokālo un vispārējo rezistenci pret infekcijām. Izvērtējot mūsu pētījumā PGF_{2α} ietekmi uz dienu skaitu no atnešanās līdz 1.MA reizei, dienu skaits samazinājās visās pētāmo govju grupās. Tomēr būtiska ietekme tam nebija ($p>0.05$). Līdz 100 dienām PP mākslīgi bija apsēklotas 73% kontroles grupas un 64% otrās grupas govi, kas būtiski atšķīrās ($p<0.05$) no 3. un 4. grupas govi rādītājiem (attiecīgi 43% un 31%) (skatīt 6.tabulu). Izvērtējot PGF_{2α} ietekmi uz mākslīgi apsēkloto govi skaitu līdz 100 dienām PP, būtiski labāki rezultāti bija 4.grupas govi, kur ASA neatdalīja un dzīvniekus neārstēja IU (attiecīgi govi ar PGF_{2α} injekciju mākslīgi apsēklotas līdz 100 dienām PP bija 50% dzīvnieku, bet bez PGF_{2α} injekcijas - 14%) ($p<0.05$). Turpretī pārējās govi grupās rezultāti bija sliktāki govi, kas saņēma PGF_{2α} injekciju.

Vērtējot govi apsēklošanas reižu skaitu, līdz iestājās grūsnība, jeb apsēklošanas indeksu, optimāls rezultāts bija vērojams tikai 2. grupas govi (attiecīgi 1.75 ± 0.37 reizes). Kaut gan Rokde *et al.* (2017) norāda, ka apsēklošanas indeks ir būtiski lielāks govi ar ASA nekā kontroles grupas govi (attiecīgi 2.39 ± 0.14 pret 1.33 ± 0.07). Līdzīgi arī Hossain *et al.* (2015) apraksta, ka govi ar ASA apsēklošanas indeks – 2.89 ± 0.78 reizes. Izvērtējot mūsu pētījumā grūsnīgo govi procentu no pirmās apsēklošanas reizes, salīdzinoši labāki rādītāji bija 4. grupas govi (38%), kaut gan bezgrūsnības periods bija viens no garākajiem (160 ± 25.03 dienas).

Visaugstākais grūsno govju procents līdz 150 dienām PP vērojams otrajā grupā – 43%. Otrs augstākais rezultāts bija 4. grupas govīm (38%). Būtiskas atšķirības bija vērojamas tikai starp 2. un 3. grupas govīm (43% pret 29%) ($p<0.05$). Izvērtējot PGF_{2a} ietekmi uz govju grūsnību līdz 150 dienām PP, būtiski labāki rezultāti bija 4.grupas govīm, kur ASA neatdalīja un dzīvniekus neārstēja IU (attiecīgi govīm ar PGF_{2a} injekciju grūsnība līdz 150 dienām PP bija iestājusies 67% dzīvniekiem, bet bez PGF_{2a} injekcijas - 11%) ($p<0.05$). Pirmās un trešās grupas govīm, kas bija saņēmušas PGF_{2a} injekciju, grūsnības rezultāti līdz 150 dienām PP bija būtiski sliktāki (attiecīgi 1.grupas govīm 25% ar PGF_{2a} injekciju un 43% govīm bez PGF_{2a} injekcijas ($p<0.05$), bet 3.grupas govīm 20% ar PGF_{2a} injekciju un 40% govīm bez PGF_{2a} injekcijas ($p<0.05$)). Visām pētījumā iesaistītajām govīm grūsnība līdz 200 dienām PP bija 40–50% robežās, un nebija būtiskas atšķirības starp govīm, kuras bija vai nebija saņēmušas PGF_{2a} injekcijas.

Izvērtējot bezgrūsnības periodu visīsākais bezgrūsnības periods no govju grupām ar ASA bija 2. grupas govīm (126 ± 18.08 dienas), visgarākais – 4. grupas govīm (160 ± 25.03 dienas) ($p>0.05$). Hossain *et al.* (2015) apraksta, ka govīm ar ASA bezgrūsnības periods ir 108.45 ± 9.34 dienas. Djuricic *et al.* (2011) konstatēja, ka manuāli atdalot aizturētās augļa segas, pagarinās bezgrūsnības periods. Izvērtējot PGF_{2a} ietekmi uz bezgrūsnības periodu, jāmin, ka, pielietojot PGF_{2a}, rezultāti mūsu pētījumā visās grupās bija sliktāki, izņemot 4. govju grupu.

Vērtējot govju reprodukciju, svarīgi ir arī zināt no ganāmpulka izbrāķēto govju skaitu un iemeslus. Dažādu iemeslu dēļ (neauglība, anestrus, smagi mastīti, norauts pupa gals, glumenieka dislokācija, aklās zarnas dilatācija, nagu problēmas (klibumi), aknu taukainā degenerācija) kopā no 60 govīm 23 esošajā laktācijā tika izbrāķētas. Kontroles grupā izbrāķēja 4 govīs (27%, govju vidējais vecums bija 3.25 ± 0.48 gadi un 2.25 ± 0.48 laktācijas), otrajā un trešajā grupā pa 7 govīm (47%), bet ceturtajā govju grupā tās bija 5 govīs (33%). ASA grupas govju vidējais vecums bija 3.94 ± 0.45 gadi un 2.89 ± 0.44 laktācijas. Otrajā un trešajā govju grupā bija būtiski vairāk izbrāķētas govīs nekā kontroles (1.grupā) un ceturtajā govju grupā ($p<0.05$). Dubuc *et al.* (2011) savā pārskatā norāda, ka dažām dzemdes slimībām ir palielināts risks dzīvnieku brāķēšanai, piemēram, metrīta un ASA gadījumā, kad risks pastāv agrā laktācijas fāzē (30 dienas PP) vai vēlākā laktācijas fāzē (ap 300. dienu PP). Beagley *et al.* (2010) norāda, ka ne tikai dzemdes slimības varētu būt dzīvnieku brāķēšanas iemesls ASA gadījumā, bet tas var būt arī citas pēcatnešanās slimības dēļ, kas kombinējas kopā ar ASA.

Ekonomiskās izmaksas dažādām augļa segu aiztures ārstēšanas metodēm

Augļa segu aizture rada ekonomiskos zaudējumus saimniecībām gan neiegūtā piena veidā, gan samazinātās, sliktās reprodukcijas veidā un līdz ar to netiek iegūts viens pēcnācējs gadā, gan dažādu citu slimību veidā, kuras

izveidojas ASA rezultātā. Par to, ka varētu būt augla segu aizture liecina vairāki faktori dzīvniekiem pirms un pēc dzemdībām. Piemēram, govju grūsnības ilgums. Govju grūsnības ilgums var ietekmēt dzīvnieka turpmāko laktāciju un reprodukcijas rādītājus. Tā pagarināšanās vai saīsināšanās rezultātā var izveidoties augļa segu aizture (Han & Kim, 2005; Shenavai *et al.*, 2010; Hossein-Zadeh & Ardalan, 2011; Hossain *et al.*, 2015). Mūsu pētījumā kontroles grupas govīm grūsnības ilgums bija 281.40 ± 1.37 dienas, kas ieklāvās fizioloģisko normu robežās, bet govīm ar ASA tas bija būtiski īsāks (273.18 ± 1.03 dienas) ($p < 0.05$).

Govju cietstāves ilgums var ietekmēt dzīvnieka pēcatnešanās periodu. Watters (2008) ar savu zinātnieku grupu norāda, ka saīsināts cietstāves laiks var būt kā cēlonis augļa segu aizturei. Lai to noskaidrotu, tad pētījumā iesaistītiem dzīvniekiem (vairākreiz dzemdējušām govīm ($n=42$)) aplūkojām cietstāves perioda (CP) ilgumu *post factum*. Tā kā telēm ($n=18$) nav cietstāves perioda, tās aprēķinos netika iekļautas. Kontroles grupas govīm, kur augļu segas atdalījās 24 h PP, vidējais CP ilgums bija 66 ± 4.8 dienas (57–101 dienas). Turpretī govīm ar ASA vidējais CP ilgums kopumā bija 58 ± 3.7 dienas. To iedalījām: saīsinātā (CP) – vidēji tas bija 30 ± 5.2 dienas (4–46 dienas); tradicionālā CP – vidēji tas bija 63 ± 1.6 dienas (47–70 dienas); pagarinātā CP – vidēji tas bija 79 ± 4.5 dienas (71–108 dienas). Procentuāli govīm ar ASA saīsinātais un pagarinātais CP bija 54% gadījumos, bet tradicionālais - 46% gadījumos. Statistiski būtisku atšķirību starp CP ilgumu nebija, tomēr ASA biežāk veidojās pēc saīsināta vai pagarināta cietstāves perioda ($p > 0.05$). Curtis *et al.* (1985) un Santschi *et al.* (2011) savos pētījumos ir atklājuši, ka vecākām govīm saīsināta cietstāves perioda ietekmē rodas ASA. Kaut gan Coppock *et al.* (1974) nesaskata saistību starp cietstāves perioda ilgumu un ASA, tomēr tas bija jau vairāk nekā pirms 30 gadiem, un tobrīd govis bija mazražīgas (Watters *et al.*, 2008).

Kā cēlonis ASA var būt arī pēcnācēju dzimums, skaits un vai tie piedzimuši dzīvi vai miruši. Mūsu pētījumā kontroles grupas govīm skaitliski vairāk bija telītes – 9 (56%), mazāk bullīši – 5 (31%) un vienā gadījumā – dvīni (13%). Turpretī govju grupās ar ASA vairāk bija dzimuši bullīši – 23 (40%) ($p > 0.05$) un būtiski mazāk telītes – 14 (25%) ($p < 0.05$), kā arī statistiski būtiski vairāk bija dvīnu – 8 (28%) un nedzīvi dzimušo teļu – 4 (7%) ($p < 0.05$). To arī apstiprina citi autoru pētījumi, kur minēts, ka ASA biežāk rodas pēc dvīnu, bullīšu, nedzīvi dzimušu teļu piedzīmšanas apgrūtinātās dzemdībās (LeBlanc, 2007; Gaafar *et al.*, 2010; Hossein-Zadeh & Ardalan, 2011; Islam *et al.*, 2012; Tucho & Ahmed, 2017).

Arī govju vecums un laktācijas skaitlis var būt kā iemesls ASA. Mūsu pētījumā kontroles grupas govju vidējais vecums bija 3.33 ± 0.35 gadi, bet govīm ar ASA – 4.10 ± 0.27 gadi ($p > 0.05$). Vidējais laktācijas kārtas skaitlis, kontroles grupas govīm bija 2.13 ± 0.32 , govīm ar ASA – 2.91 ± 0.26 laktācijas ($p > 0.05$). Arī citu autoru pētījumi apstiprina, ka ASA vairāk ir novērota vecākām govīm ar lielāku laktācijas skaitli, it sevišķi karstās vasarās (Curtis *et al.*, 1985;

Shenavai *et al.*, 2010; Hosseini-Zadeh & Ardalan, 2011; Hossain *et al.*, 2015; Tucho & Ahmed, 2017). To apstiprina vēl arī citi autori, ka, palielinoties govju vecumam un laktāciju skaitam, procentuāli palielinās govju skaits ar ASA (Saloniemi *et al.*, 1986; Stevenson & Call, 1988; Sarder *et al.*, 2010; Gaafar *et al.*, 2010; Azad, 2010; Islam *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2017). Tomēr vairāki autori norāda, ka ne tikai govju vecums ietekmē ASA veidošanos, bet arī gadalaiks, kad dzīvnieki atnesās (Deyab, 2000; Gabr *et al.*, 2005; Gaafar *et al.*, 2010; Hossain *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2017). Mūsu pētījumā būtiski vairāk ASA izveidojās tām govīm, kas dzemēja vasarā un rudenī (attiecīgi 42% un 29%) nekā ziemā un pavasarī (attiecīgi 16% un 13%) ($p<0.05$). Arī Deyab (2000), Gabr *et al.* (2005), Gaafar *et al.* (2010), Hossain *et al.* (2015), Sharma *et al.* (2017) savos pētījumos ir atklājuši, ka ASA biežāk rodas, ja govis dzemē pavasarī un vasarā, kas daļēji saskan ar mūsu pētījumu.

Izvērtējot ekonomiskos rādītājus, rezultāti nav viennozīmīgi (skatīt 7.tabulā). Lai varētu aprēķināt un pierādīt, kura no ASA ārstēšanas metodēm mūsu pētījumā ir radījusi mazākus ekonomiskos zaudējums, tad izmantojām formulas, kas aprēķina faktiskos ekonomiskos zaudējumus (FEZ).

7.tabula/*Table 7*

**Faktiskie ekonomiskie zaudējumi govīm ar ASA/
Actual economic losses for cows with RFM**

Analizējamie rādītāji/ <i>Indicators to be analyzed</i>	2.govju grupa/ <i>Group 2</i>	3.govju grupa/ <i>Group 3</i>	4.govju grupa/ <i>Group 4</i>
FEZ, piespiedu likvidēšanas gadījumā, eiro/ <i>Actual economic losses in case of compulsory culling, euro</i>	280	280	200
FEZ, salīdzinot produktivitātes zaudējumu slimajiem attiecībā pret veselajiem dzīvniekiem ganāmpulkā, eiro/ <i>Actual economic losses comparing the loss of productivity for cows with RFM and without it, euro</i>	2282.63	99.64	1344.87
FEZ, neiegūstot gada laikā pēc dzemdībām jaunpiedzimušos, eiro/ <i>Actual economic losses without obtaining a newborn within one year after delivery, euro</i>	877.23	712.06	877.23

7.tabulas nobeigums/*End of Table 7*

Analizējamie rādītāji/ Indicators to be analyzed	2.govju grupa/ Group 2	3.govju grupa/ Group 3	4.govju grupa/ Group 4
Veterinārās izmaksas/ <i>Veterinary costs</i>	500	300	450
Kopējie zaudējumi, eiro/ <i>Total losses, euro</i>	3939.86	1391.70	2872.10

1. govju grupa–kontroles grupas govis; 2. govju grupa–govi ar ASA, kur tās atdala un dzīvniekus ārstē; 3. govju grupa–govi ar ASA, kur tās neatdala un dzīvniekus ārstē; 4. govju grupa–govi ar ASA, kur tās neatdala un dzīvniekus neārstē IU.

Group 1 – control group; group 2 – cows RFM, which were manually removed and treated IU; group 3 – cows with RFM, which were not removed and treated IU; group 4 – cows with RFM, which were not removed and not treated IU.

Faktiskie ekonomiskie zaudējumi piespiedu dzīvnieku likvidācijas gadījumā mazāk bija govju grupā, kur aizturētās augļa segas neatdalīja un dzīvniekus neārstēja IU, jo likvidēto dzīvnieku skaits šajā grupā bija mazāks nekā pārējās divās grupās ar ASA. Tomēr zemāki FEZ par neiegūtu pienu jeb zaudēto produktivitāti un gada laikā neiegūtiem jaundzimušajiem bija govīm, kur aizturētās augļa segas neatdalīja, bet IU lietoja antibakteriālos bolus (attiecīgi 99.64 eiro un 712.06 eiro). Turpretī, govīm, kurām aizturētās augļa segas atdalīja manuāli un ārstēja IU, FEZ par zaudēto produktivitāti bija visaugstākie (attiecīgi 2282.63 eiro).

Veterinārās izmaksas, ko sastādīja izlietotie medikamenti, ko izmantoja pie ASA ārstēšanas, veterinārsta darbs, strādnieka darbs, kas katru dienu mērīja dzīvniekiem temperatūru un novēroja tos, citu slimību ārstēšana, kas radās ASA rezultātā (metrīti, endometrīti), profilaktiskie pasākumi, lai izvairītos no dažādām vielmaiņas slimībām, kas var rasties ASA rezultātā. Šie visi izdevumi veidoja veterinārās izmaksas un viszemākās šīs izmaksas bija trešās grupas govīm, kur aizturētās augļa segas neatdalīja un dzīvniekus ārstēja IU.

Izvērtējot kopumā visus ekonomiskos zaudējumus, viszemākie tie bija trešās grupas govīm, kur aizturētās augļa segas neatdalīja un dzīvniekus ārstēja IU (attiecīgi 1391.70 eiro), bet visvairāk ekonomiskie zaudējumi bija otrās grupas govīm, kur aizturētās augļa segas atdalīja manuāli un dzīvniekus ārstēja IU (attiecīgi 3939.86 eiro).

Aprēķinot faktiskos ekonomiskos zaudējumus, vadījāmies pēc Brūvera (1987) ieteiktajām vadlīnijām veterinārā darba ekonomikas zinātnē izstrādātajām formulām, kur uzmanība tika pievērsta šo FEZ - dzīvniekus izbrāķējot, zaudētajā produkcijā, neiegūtos jaundzimušos tełos gada laikā un

veterinārajās izmaksās. Turpretim, Mahnani *et al.* (2021) piedāvā citu formulu kā varētu aprēķināt ekonomiskās ASA izmaksas (eiro/laktācijā) = $\frac{1}{4}$ izmaksas no samazinātās piena ražošanas (neiegūtais piens) + izmaksas, kas saistīs ar piena ierobežojumu lietot to cilvēka uzturā (piens jāiznīcina), kamēr norit ASA ārstēšanas process + aizstāšanas izmaksas (priekšlaicīga dzīvnieka nokaušana) + samazinātās auglības rezultātā radušās izmaksas + ārstēšanas un medikamentu izmaksas + darbinieku izmaksas.

Svaigpiena iepirkuma cena Latvijā nav patstāvīgas. Tās var svārstīties līdz pat 23%. Pētījuma laikā no 2007.gada līdz 2009.gada janvārim svaigpiena iepirkuma cenas svārstījās no 0.24 - 0.34 eiro/kg, vidēji tā bija 27.00 eiro/kg. Ražošanas izmaksas uz pētījuma laiku ganāmpulkos bija 0.24 eiro/kg saražotā piena. Šobrīd Latvijā svaigpiena iepirkuma cena svārstās no 0.34 - 0.36 eiro/kg (LDC datu bāze, reģistri). Ražošanas izmaksas, ko sastāda mainīgās un patstāvīgās izmaksas, šobrīd lielajām piena lopkopības fermām Latvijā ir no 0.26 - 0.30 eiro/kg saražotā piena (Latvijas lauku konsultāciju un izglītības centra apkopotie dati). Lai gan ražošanas cenas un piena iepirkuma cenas ir paaugstinājušās par pāris centiem, tomēr iegūtie dati mūsu pētījumā ir mūsdienīgi un nav novecojuši.

SECINĀJUMI

1. Neatkarīgi no izvēlētās augļa segu aiztures ārstēšanas metodes, govīm ar augļa segu aizturi pilnīga dzemdes involūcija pēc dzemdībām bija notikusi par 14 dienām vēlāk nekā kontroles grupas govīm. Olnīcu funkciju cikliskā aktivitātē pētījuma govīm atjaunojās ar 15-to un 18-to dienu pēc dzemdībām. Par ko liecināja progesterona līmeņa paaugstināšanās asins serumā 18. un 22. dienā pēc dzemdībām un nebija būtiskas atšķirības starp govīju grupām ar augļa segu aizturi.
2. Govīm otrajā dienā pēc dzemdībām hematoloģiskajā ainā bija vērojama leikocītu novirze pa kreisi ar tendenci normalizēties 6 nedēļu laikā. Trešajā nedēļā pēc dzemdībām govīm ar augļa segu aizturi paaugstinājās segmentkodolaino leikocītu skaits, kas norādīja uz iekaisuma procesa aktualizēšanos šajā laikā. Asins bioķīmiskie rādītāji govīm, bez augļa segu aiztures un ar to, norādīja uz intrahepatiskiem žults nooplūdes traucējumiem.
3. Visbiežāk dzemdes dobuma bakterioloģiskajos paraugos govīm bez augļa segu aiztures un ar to bija konstatēti *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp. un *Clostridium* spp. mikroorganismi pārstāvji, kur 42 dienu laikā pēc dzemdībām būtiski samazinājās govīju skaits, kurām tos konstatēja. Mazāk dzemdes dobuma mikrofloras daudzveidība bija konstatēta govīm, kurām aizturētās augļa segas neatdala un dzīvnieku neārstē IU.

- Histoloģiski izvērtējot dzemdes gлотādu 42. dienā pēc dzemdībām, govīm ar augļa segu aizturi, neatkarīgi no ārstēšanas metodes, 40 – 47 % gadījumos konstatēja limfocītus un limfocītāros sakopojumus, makrofāgus, plazmocītus, eozinofilos leikocītus un hemosiderīna ieslēgumus, kas liecināja par subklīnisko endometrītu. Izteiktāks tas bija govīm, kur aizturētās augļa segas neatdala un dzīvniekus ārstē IU.
- Izmantojot imūnhistokīmisko metodi, nosakot CD3⁺ pozitīvo ekspresiju dzemdes gлотādā pētījuma govīm, bija iespējams diferencēt subklīnisko endometrītu no fizioloģiskās limfocītu infiltrācijas govju dzemdes gлотādā dažādas meklēšanās cikla fāzēs, jo paaugstinātais estrogēna līmenis asinīs ierosināja aktīvu neutrofilo leikocītu migrāciju dzemdē, kas tālāk savukārt palielināja fagocitozi un bakterīcīdo aktivitāti tajā.
- Izvērtējot dažādo ASA ārstēšanas metožu ietekmi uz turpmāko laktāciju, būtisku atšķirību piena izslaukuma ziņā starp govju grupām nenovēroja. Tomēr ekonomiskajā ziņā visvairāk neiegūtais piens pirmajās 100 dienās pēc dzemdībām un visaugstākais somatisko šūnu skaits standartlaktācijā bija govīm, kur aizturētās augļa segas atdalīja manuāli un dzīvniekus ārstē IU.
- Augļa segu aiztures ārstēšanas metožu ietekme uz govju reprodukcijas rādītājiem nebija viennozīmīga, jo nebija izteikti labāki vai sliktāki rezultāti kādai vienai noteiktai ārstēšanas metodei. Būtiski vairāk apsēkloto govju skaits līdz 100 dienai PP bija govīm, kur augļa segas atdala manuāli un dzīvniekus ārstē IU. Tomēr būtiski augstāks grūsno govju skaits no 1.MA reizes un būtiski mazāks izbrāķeto govju skaits bija govju grupā, kur ASA neatdala un dzīvnieku neārstē IU.
- Mūsu pētījumā ekonomiski labākus rezultātus uzrādīja govju grupa, kur aizturētās augļa segas neatdala un dzīvniekus ārstē IU.

IETEIKUMI PRAKSEI

- Lai izvērtētu vai neveidojas metrīts, pēc augļa segu aiztures ārstēšanas uzsākšanas, dzīvnieks jānovēro 14 dienas pēc atnešanās, sekojot līdzi govju ķermenā temperatūras izmaiņām un izdalījumu raksturam no dzemdību ceļiem. Īpaši, ja izvēlas aizturētās augļa segas neatdalīt un dzīvnieku neārstēt IU.
- Manuālo augļa segu atdalīšanu drīkst izvēlēties tikai tad, ja augļa segas viegli atdalās no karunkuliem. Sākumā izmēģinām atdalīt augļa segas no 2-3 karunkuliem, ja tās viegli atdalās, tad turpinām, bet ja ne, tad šo procedūru pārtraucam un izvēlamies citu augļa segu aiztures ārstēšanas metodi.

3. Lai veiksmīgāk varētu ārstēt pēc augļa segu aiztures izveidojušos dzemdes dobuma iekaisumus, tad izlases veidā būtu ieteicams veikt mikrobioloģisko izmeklēšanu un antibiogrammu dzemdes dobuma saturam.

ZINĀTNISKĀS PUBLIKĀCIJAS UN TĒZES

1. Skuja, S., Antāne, V., Lūsis, I. (2021). *Effects of retained fetal membranes treatments and dry period length on the subsequent lactation in cows - milk yield and somatic cell count. Agronomy Research*, 19(1), 265–275, 2021. DOI: <https://doi.org/10.15159/AR.20.242> Received: October 13th, 2020; Accepted: December 14th, 2020; Published: December 18th 2020. **Scopus un Web of Science** datu bāzē.
2. Skuja, S., Antāne V. (2017). *Effects of the treatment method of reproductive performance in cows with retention of fetal membranes. Rural Sustainability Research*. Warsaw: De Gruyter Open, 2017. Vol. 38(333), 14.-23. DOI: <https://doi.org/10.1515/plua-2017-0008>
3. Skuja, S., Antāne, V. (2010). *Postpartum serum biochemical and haematological changes in cows with and without retained fetal membranes. Research for rural development 2010: annual 16th international scientific conference proceedings*, Jelgava, 19-21 May 2010 / Latvia University of Agriculture. Jelgava LLU, 2010. Vol.2, 6.-11. **Scopus un Web of Science** datu bāzē.
4. Skuja, S., Antāne, V. (2012). Progesterona līmeņa un reprodukcijas rādītāju salīdzinājums slaucamajām govīm ar un bez augļa segu aiztures = *Comparison of progesterone levels and reproductive performance in dairy cows with and without retained fetal membranes*. Dzīvnieki. Veselība. Pārtikas higiēna: konferences "Veterinārmedicīnas zinātnes un prakses aktualitātes" raksti, Jelgava, 2012. gada 22.-23. novembrī / Latvijas Lauksaimniecības universitāte. Veterinārmedicīnas fakultāte. (*Veterinārmedicīnas raksti 2012*). Jelgava: LLU, 136.-142.
5. Skuja, S., Antāne, V. (2010). *The ovary activity in cows with and without retained fetal membranes*. Dzīvnieki. Veselība. Pārtikas higiēna: starptautiskās zinātniskās konferences raksti, Jelgava, 2010. gada 29. oktobrī / Latvijas Lauksaimniecības universitāte. Veterinārmedicīnas fakultāte. (*Veterinārmedicīnas raksti 2010*). Jelgava: LLU, 117.-124.
6. Skuja, S., Antāne, V. (2010). *Bacteriological and morphological studies of cow's uterus with and without retained fetal membranes. 14th International conference on production diseases in farm animals (ICPD): book of*

proceedings, Ghent, Belgium, 20-24 June 2010 / Ghent University. Ghent. 99-100.

7. Skuja, S., Antāne, V. (2010). *Concentration of progesterone in the blood serum in cows with and without retained fetal membranes. 8th International Ruminant reproduction symposium: program and abstracts, Anchorage, Alaska, September 3-7, 2010. Anchorage, 160.*
8. Skuja, S., Antāne, V. (2008). Dzemdes bakterioloģisko, histoloģisko un reprodukcijas rādītāju salīdzinājums govīm ar un bez augļa segu aiztures = *Comparison of bacteriological and histological parameters and reproductive performance in cows uterus with and without retained fetal membranes.* Dzīvnieki. Veselība. Pārtikas higiēna: starptautiskās zinātniskās konferences raksti, Jelgava, 2008. gada 14. novembrī. Latvijas Lauksaimniecības universitāte. Veterinārmadicīnas fakultāte. (*Veterinārmadicīnas raksti 2008*). Jelgava: LLU, 2008. 164-169.
9. Skuja, S., Antāne, V., Feldmane, L. (2008). *Bacteriological and histological studies of cow's uterus without and with retained fetal membranes. Reproduction in Domestic Animals. Vol.43 Suppl.3: 16th International congress on animal reproduction. 65. Web of Science datu bāzē.*

INTRODUCTION

Retained fetal membranes is a pathological condition caused by the omission of the third stage of labour during parturition, i.e., the fetal membranes are not expelled from the uterus. Physiologically, this occurs within 6–8 hours after the second stage of labour (expulsion of the fetus from the uterus and delivery routes). Opinions are divided on the period of time during which fetal membranes can be considered to be retained - one opinion is that retention occurs, if the fetal membranes are not detached within 8–12 hours after the calf is born, and the other opinion is - if they are not detached within 24 hours. However, the current general agreement in scientific circles is that, if the fetal membranes do not separate within 12–24 hours after the fetus is expelled, retention of the fetal membranes has occurred (Drillich *et al.*, 2006; Hashem & Amer, 2008; Beagley *et al.*, 2010; Islam *et al.*, 2013).

Retention of fetal membranes (RFM) in dairy herds can occur in 5–10% of cases (LeBlank, 2008), and sometimes even up to 15% of all cases (Gilbert, 2016). There are multiple factors that affect the separation of the fetal membranes or failure thereof. They include hereditary, dietary, immunological and pathological factors. Not all causes and predisposing factors for RFM are fully understood, but one of the most important causes of RFM is related to structural changes in cathelidones and changes in hormonal processes (Djuricic *et al.*, 2011). RFM delays uterine involution and may develop metritis, endometritis, which can further lead to fertility problems (Gröhn & Rajala-Schultz, 2000; Maizon *et al.*, 2004). As a result of RFM, not only is the milk yield decrease of an animal but also the first heat is missed, the calving interval is prolonged and additional costs for treatment are incurred (Kankofer, 1996), as well as infertility may occur (Tucho & Ahmed, 2017).

For many years, controversial opinions have co-existed regarding the most appropriate, best, most economical and most effective treatment methods of RFM. It is important to choose the most effective therapy method for cows with RFM. Many different treatment options of RFM with relative efficacy have been described. The results obtained by different groups of scientists are contradictory or even have a negative effect on the future reproduction of cows (Frazer, 2005; Drillich *et al.*, 2007). The most controversial method is the manual removal of fetal membranes (Peters & Laven, 1996; Stevens & Dinsmore, 1997; Drillich *et al.*, 2006, 2007). However, there is less inconsistency between the administration of intrauterine or systemic antibiotics and the use of prostaglandins or oestradiol in RFM (Drillich *et al.*, 2006, 2007). When choosing a treatment method of RFM, it is also important to consider how this treatment will affect the future lactation of the animal (i.e. milk yield and somatic cell count (SCC)).

The aim of the study was to find out the method of treatment of fetal membrane retention that is most economically beneficial and suitable for the conditions of Latvia and which, as a result, has a positive effect on the future lactation and reproduction of cows.

Objectives of the doctoral thesis

1. To evaluate uterine involution using rectal and ultrasonographic examination, as well as ovarian functional status, using a rectal, ultrasonographic, and uterine immunohistochemical examination method in cows with and without fetal membranes retention;
2. To explore the morphological and biochemical parameters of blood and the dynamics of progesterone levels in the blood serum of cows with and without the retention of fetal membranes;
3. To analyse the bacterial microflora of cows' uterus with and without the fetal membranes' retention;
4. To determine the histological picture of the uterus endometrium on day 42 after calving in cows with and without retention of the fetal membranes, using histological and immunohistological examination methods;
5. To evaluate the effect of different treatment methods of retained fetal membranes on further lactation, using milk yield and somatic cell count parameters;
6. To evaluate the effectiveness of different treatment methods for cows with fetal membranes retention, using reproductive parameters;
7. To calculate the economic costs of different treatment methods of retained fetal membranes.

Scientific novelty of the research

1. For the first time in Latvia, original data have been obtained for Holstein black and white cows on the impact of various treatment methods of the retention of fetal membranes on the subsequent lactation and reproduction of cows.
2. Original data for Holstein black and white cows on the effect of different treatment methods of fetal membranes on the number of somatic cells in subsequent lactation have been obtained.
3. Original data for Holstein black and white cows on uterine involution and ovarian cyclic activity, blood morphological and biochemical parameters, uterine microbiological examinations, and uterine endometrium biopsy histological and immunohistological examinations in the postpartum

period between different treatment methods of retained fetal membranes have been evaluated and obtained.

APPROBATION OF THE RESEARCH RESULTS

Research results are approbated in the following scientific conferences:

1. Skuja, S., Antāne, V. *Comparison of progesterone levels and reproductive performance in dairy cows with and without retained fetal membranes.* "Animals. Health. Food Hygiene": Conference "Topical Issues in Veterinary Medicine Science and Practice", Jelgava, November 22-23, 2012 / Latvia University of Agriculture. Faculty of Veterinary Medicine. (Veterinary Articles 2012). Jelgava: LLU, 136 - 142. Oral presentation.
2. Skuja, S., Antāne, V. *Postpartum serum biochemical and haematological changes in cows with and without retained fetal membranes.* Research for rural development 2010: annual 16th international scientific conference proceedings, Jelgava, 19-21 May 2010 / Latvia University of Agriculture. Jelgava: LLU. Oral presentation.
3. Skuja, S., Antāne, V. *The ovary activity in cows with and without retained fetal membranes.* "Animals. Health. Food Hygiene": International Scientific Conference, Jelgava, October 29, 2010 / Latvia University of Agriculture. Faculty of Veterinary Medicine. Jelgava: LLU. Oral presentation.
4. Skuja, S., Antāne, V. *Comparison of bacteriological and histological parameters and reproductive performance in cows uterus with and without retained fetal membranes.* "Animals. Health. Food hygiene": international scientific conferences. Jelgava, November 14, 2008. Latvian University of Agriculture. Faculty of Veterinary Medicine. Jelgava: LLU. Oral presentation.
5. Skuja, S., Antāne, V. *Bacteriological and morphological studies of cow's uterus with and without retained fetal membranes.* 14th International conference on production diseases in farm animals (ICPD): Ghent, Belgium, 20-24 June 2010 / Ghent University. Ghent, 2010. Poster presentation.
6. Skuja, S., Antāne, V. *Concentration of progesterone in the blood serum in cows with and without retained fetal membranes.* 8th International Ruminant reproduction symposium: Anchorage, Alaska, September 3-7, 2010. Anchorage. Poster presentation.
7. Skuja, S., Antāne, V., Feldmane, L. *Bacteriological and histological studies of cow's uterus without and with retained fetal membranes.* 16th

International congress on animal reproduction; (2008). 2008, July, 13–18, Budapest, Hungary. Poster presentation.

Volume of the research: The doctoral thesis is drawn up on 120 pages and consists of an introduction, literature review, material and methods, research results, discussion, 15 tables and 32 figures are included in the work, 8 conclusions, 3 recommendations for practice, 270 literature sources and 3 annexes.

MATERIAL AND METHODS

CHARACTERISTICS OF THE MATERIAL

The research was conducted in the time period from September 2007 to January 2009.

The study used 60 Holstein black and white cows of different ages (two to eight years old) from the herd of farm "A" in Dobele region with 650 dairy cows, and from the herd of farm "B" in Jelgava region with 300 dairy cows. During the study, the average milk yield during standard lactation in the first farm amounted to $7,968.94 \pm 36.30$ kg, while the somatic cell count (SCC) was 228.63 ± 9.49 thousand cells mL^{-1} . Respectively, at the second farm, average milk yield during standard lactation was $6,447.70 \pm 60.41$ kg, but the SCC - 193.57 ± 10.59 thousand cells mL^{-1} . The animals were fed according to the feed ration standards for dairy cows. The housing, care and feeding of the animals were similar at both farms: the cows were milked and fed twice a day and the water was freely available.

On the second day after calving, the body condition of the cows was determined on a 5-point system according to the Mulvany (1977) body condition evaluation system (where 1 point conforms to a very thin cow, but 5 points refers to fat, obese cow). The groups of study cows were developed in accordance with the principle of group homogeneity. The target body condition after delivery is from 2.5 to 3.7 points, in older cows 3.5 to 4.0 points are permissible. In our study, the average feeding level of the control cows was 3.7 ± 0.04 points, as well as cows with RFM - 3.7 ± 0.02 points.

The study cows were divided into 4 groups. The distribution of cows by group is demonstrated in Table 1.

The first group of cows was the control group - clinically healthy cows without RFM. The cows of the second, third and fourth groups were clinically healthy, but with RFM. Cows of the second and third groups received 3 antibacterial boluses in the uterine cavity - *Gynobiotic* (neomycin sulphate 350,000 IU, oxytetracycline hydrochloride 500 mg). Cows with retained fetal membranes, in which, after the attempts to remove the first three caruncles, they

were easily detached and the retained fetal membranes could be removed within five to eight minutes, were included in the second group. The third group consisted of cows with retained fetal membranes, which did not separate when trying to separate them from the first three caruncles. The fourth group included cows that had retention of fetal membranes and that were very active, and had a good appetite. There were no significant differences in the mean age, lactation number and milk yield of the groups of cows.

If the cows had a body temperature of ≥ 39.5 °C, the need for general treatment was assessed. If they had a body temperature of ≥ 39.5 °C but still had an appetite, the general treatment of the animal was performed with ceftiofur hydrochloride (1.1 mg/kg subcutaneously once daily for 3 consecutive days). In contrast, if the animal did not eat, was apathetic, slept more, and had a body temperature of > 39.5 °C, 10 mg/kg of procaine benzylpenicillin was injected intramuscularly once daily for 5 consecutive days. There were 2 cows in the control group, one treated with procaine benzylpenicillin and the other – with ceftiofur hydrochloride. In the second group of cows, one cow was treated with procaine benzylpenicillin. In the third group of cows, 3 cows were treated with ceftiofur hydrochloride, and in Group 4, 3 cows were treated with procaine benzylpenicillin and 3 cows – with ceftiofur hydrochloride.

In each group, on days 8 and 21 postpartum, some cows were injected with synthetic PGF_{2 α} - cloprostenol (as sodium salt) 500 µg/animal per injection to test whether it promotes better ovarian function, uterine involution, reduces the risk of uterine inflammation and improves pregnancy outcomes. In the control group, eight cows received the PGF_{2 α} injection, in Group 2 - five cows, in Group 3 - 10 animals, and in Group 4 the number of cows that received the PGF_{2 α} injection was six. Cows to be injected with PGF_{2 α} were identified by farm veterinarians (based on the condition of the animal and behaviour in the room and body temperature).

Dry period length for study cows

The effect of the dry period (DP) on fetal membrane retention in cows was determined *post factum*. The number of days of dry period for each animal involved in the study after calving was obtained from the data of the state agency “Agricultural Data Center” (ADC) (www.ldc.gov.lv). The dry period was divided into: shortened DP (n = 9), where the dry period was less than 46 days, traditional DP (n = 15), where the dry period was from 47 to 70 days, and extended DP (n = 9), where the dry period was longer than 70 days. The total number of animals included in the study was 60, of which 42 were cows and 18 – heifers. As heifers do not have a dry period, in this section we only evaluated cows - nine cows in the control group, and 33 cows in the group with RFM.

Milk yield and somatic cell count in the milk of cows included in the study

For the cows involved in the study, milk yield and somatic cell count (SCC) values for current and previous lactation were obtained from the data of ADC for 2006, 2007, 2008 and 2009. Both parameters were assessed during the first 30 days of PP, the first 100 days of PP, and standard lactation (305–days milk yield).

42 animals (cows that had multiple deliveries with at least two lactations) were included into estimates of the effects of RFM treatments on milk yield and SCC. The effect of RFM treatment methods on milk yield and SCC can be assessed if the milk yield and SCC of previous lactation are known. The difference between milk yield and SCC was calculated by subtracting the data of the previous lactation from the data of current lactation. We accepted 200,000 cells mL⁻¹ as the optimal SCC threshold, based on studies of many scientists (DeGraves & Fetrow, 1993; Harmon, 1994; Hillerton, 1999; Madousse *et al.*, 2008; Lusis *et al.*, 2010; Petzer *et al.*, 2017; Lusis *et al.*, 2019). Prior to statistical comparison, all somatic cell count data were converted to logarithmic [$\log_2 (SCC \times 10^{-5}) + 3$] somatic cell scores (SCS). The lactation average SCS was the arithmetic mean of the monthly test day SCC from 7 to 305 days after calving.

It is important to know the production costs of farms and the payment per kilogram of milk, in order to analyse cow milk yield and SCC figures. During the study, the average production cost in herds to produce 1 kilogram of milk was 0.24 euro, but the average purchase price of milk was 0.27 euro. Consequently, the total loss per each kilogram of milk not obtained was 0.51 euro.

Reproduction rates in the cows included in the study

The following reproduction parameters were analysed for the cows involved in the study: interval from calving to the first artificial insemination, inseminated cows up to 100 days PP, services per pregnancy, first service conception, pregnant cows up to 150 days PP, pregnant cows up to 200 days PP, days open and culled cows. In order to be able to calculate these figures accurately, the number of artificial inseminations per animal; the days open; data on next calving and animal culling were obtained from ADC data (2007–2010).

DESCRIPTION OF THE PROGRESS OF THE STUDY

The cows that were used in the study were registered; general health condition was assessed according to a clinical examination scheme (Kelly, 1984; Jemeljanovs *et al.*, 2007), which includes animal identification, evaluation of behaviour, posture, and body temperature measurements. Rectal and ultrasound examinations of the genitals, blood sample collection for morphological and biochemical tests, microbiological examination of the contents of the uterine cavity, as well as endometrial biopsy sample collection for histological and immunohistochemical examinations were also performed.

The gait of the study is shown in Table 2.

Data analysis was based on group averages and the comparison was performed between cow groups - control group and RFM group.

Clinical examination of animals was performed according to Kelly (1984) and Jemelyanov *et al.* (2007), rectal examination of uterus was done according to Könyves *et al.* (2009), but the ovaries according to the guidelines recommended by Senger (2003), ultrasonography of the uterus was examined according to the Kask *et al.* (1999) recommendations and ovaries according to the guidelines recommended by Senger (2003), blood morphological, biochemical and progesterone levels were tested according to LVS EN ISO 15189: 2007 standard, microbiological examination of uterine cavity content was performed according to standard methods: LVS ISO 7218: 1996 and LVS NE ISO 6887-1: 1999, as well as LVS NE ISO 4833: 2003 and Quinn *et al.*, 1994, the antimicrobial resistance test was performed by the disk diffusion method according to CLSI M31 standards, but the histological samples were examined according to Kask & Gustafson (1998), Rhyaf (2010), Pascottini & Opsomer (2016), and immunohistochemical samples were examined according to Pascottini *et al.* (2016), Martin *et al.* (2008), Ohta *et al.* (2013).

DESCRIPTION OF THE METHODS USED IN THE STUDY

General and specific clinical examination

The sex of the born calf, live or stillborn offspring, their number of calves was registered for the cows involved in the study. The age and lactation of the cow were also recorded. In 48 hours and in 4, 6, 14, 16, 18, 22, 24, 26, 28, 30, 32 and 42 days after birth, a **clinical examination** of the cow was performed - its position in the room was assessed, body temperature was measured with a medical mercury thermometer (Ningbo Huahui, China), as well as the **nature of genital discharge** was evaluated in accordance with the methodology recommended by Kask *et al.* (1999): 0 - no discharge; 1 - clear mucus is released; 2 - slight white impurities in the mucus or they are cloudy; 3

- the discharge are thick, white, purulent; 4 - the discharge are thick, brownish-red, purulent; 5 - the discharge are liquid, smelly, with pieces of pus (Kask *et al.*, 1999).

Rectal examination of the uterus in accordance with guidelines recommended by Könyves *et al.* (2009), uterine tone was determined (if not responding to rectal massage - atonic; if slightly responsive - weak tone; if well constricted - good tone), and size of the uterus (large uterus - cannot be surrounded by using a palm, located in the abdominal cavity, sometimes it has an abnormal fluid inside; a medium-sized uterus - the uterus is slightly enlarged, can be surrounded by a hand, the size of a basketball; slips slightly into the abdomen and resembles a dough-like mass; small uterus - the uterus can be surrounded by a hand, which allows one to identify and predict future genital health. Starting from the sixth day after delivery, the **ovaries** were **examined rectally** for activity (follicles, corpus luteum).

Ultrasonographic examination of cows with and without fetal membrane retention

A portable *Tringa Linear Vet* ultrasonography system (ESAOTE Pie Medical, Italy) was used for the ultrasonographic examination of cow genitals. Genital ultrasonography was performed at 5 MHz frequency on days 14, 22, 28, and 42 *postpartum* (PP) concomitantly with rectal examination. When **examining the uterus**, the content registered was grouped by the amount thereof in the uterus in accordance with the methodology recommended by Kask *et al.* (1999): 0 – fluid is absent (no anechogenic areas detected in the uterus); A - minimal amount of fluid (minor, insignificant anechogenic areas detected); B - a small amount of fluid in the uterus (10–20 ml); C - average amount of fluid in the uterus (anechogenic areas are visualised in one half of the uterus); D - large amount of fluid in the uterus (almost the whole uterus has anechogenic areas) (Kask *et al.*, 1999).

Upon the performance of **ovarian ultrasonography**, the ovaries were divided into active and inactive. For inactive ovaries we found that they are oval, small, smooth, with multiple antral (tertiary) follicles. In contrast, follicles or corpus luteum at different stages of development were found in active ovaries (Senger 2003).

Morphological and biochemical blood tests of cows with and without fetal membrane retention

Blood samples for **haematological examination** were obtained from cows on days 2, 14, 22, 28 PP. Blood samples were taken from the tail vein by using 3 ml sterile disposable blood collection tubes with K3E 7.5% 0.072 ml

anticoagulant. Samples were examined at an accredited laboratory - Ltd Central Laboratory (reg. No 215/L430-C). The laboratory is accredited in accordance with the requirements of the LVS EN ISO 15189:2007 standard.

7 ml sterile disposable blood collection tubes without anticoagulant were used to determine **biochemical parameters** in blood serum 48 hours after delivery. In contrast, 7 ml sterile disposable blood collection tubes with heparin as an anticoagulant were used to detect glutathione peroxidase samples.

Blood samples for the detection of **progesterone levels** were obtained 48 hours, and 4, 6, 14, 16, 18, 22, 24, 26, 28, 30, 32 and 42 days postpartum. Samples were taken from the tail vein in 7 ml sterile disposable blood collection tubes without anticoagulant, which were further delivered and examined at an accredited laboratory - Ltd Central Laboratory within a few hours.

Available published data (Pasquini & Pasquini, 1996; Meyer & Harvey, 2004; Kahn & Line, 2005) have been used as a basis for acceptable physiological values of biochemical and morphological blood parameters.

Collection of microbiological samples from the uterus and examination thereof in cows with and without fetal membrane retention

180 samples for microbiological examination of uterine cavity content were obtained from cows without fetal membrane retention and cows with it on days 2, 14 and 42 after calving. Sterile *Equi-Vet* (*Kruuse*, Denmark) uterine bacteriological swabs were used for sampling. After obtaining the samples, they were transported to the Institute of Food Safety, Animal Health and Environment "BIOR" within a few hours at a temperature of +4 °C, where they were examined in accordance with generally accepted standard methods. The examinations were performed according to the Clinical Veterinary Microbiology of Quinn *et al.* (1994) guidelines and according to generally accepted accredited standard methods: LVS ISO 7218: 1996 and LVS NE ISO 6887-1: 1999, as well as LVS NE ISO 4833: 2003. Bacteriological samples were tested for antimicrobial resistance (AMR). The CLSI M31 (outside the scope of LATAK accreditation) clinical laboratory standard was used for this purpose.

Samples obtained from the uterine cavity, first obtained polycylultural microorganisms and then pure crops. The following growth media were used to isolate and identify *Staphylococci* spp. microorganisms from the uterine cavity: Baird-Parker agar (Egg yolk tellurite glycine pyruvate agar (Biolife, Spain) (coagulase-positive *staphylococci* (*Staphylococcus aureus* and others), brain-heart infusion stock (OXOID, UK), Mannitol salt agar (Becton Dickinson, US), Nutrient agar enriched with 5% sheep blood.

For the detection of Gram-positive microflora (*Corynebacterium* spp., *Aerococcus urinae*, *Streptococcus* spp.), Samples of the uterine cavity were

inoculated on nutrient agar with 5% sheep blood, incubated at 37 ± 1.0 °C for 48 hours, and tested after 24 hours. Microorganisms by species were identified using the BBL Crystal (US) Gram-positive microorganism identification system. It includes multi-substrate fermentation, 33 oxidation and hydrolysis tests. Identification was also performed based on colony morphology, microscopy, and phenotypic characteristics.

Enterobacteriaceae family or Gram-negative microflora (*Klebsiella spp.*, *Escherichia coli* and *Proteus spp.*) determined using selective media: MacConkey agar (Difco BBL); Lactose TTC agar (SIFIN, Germany). The cultures were incubated at 37 ± 1.0 °C for 48 hours, and the cultures were tested after 24 hours. Microorganisms by species were identified using the BBL Crystal (US) Gram-negative microorganism identification system. It includes 33 oxidation, hydrolysis tests and fermentations of several substrates. Bacteria were identified by comparing the obtained reaction results with those in the database.

DRCM selective medium (Differential Reinforced Clostridium Medium, Scharlau Microbiology) was used to isolate anaerobic microorganisms (*Clostridium spp.*). The anaerobic medium was provided with 1 ml of sterile Vaseline oil, which was poured on top of the medium. All were incubated at 37 ± 1.0 °C for 96 hours.

Bacterial isolates were tested for antimicrobial resistance (AMR) on days 2, 14, and 42 of PP by the disk diffusion method (Kirby-Bauer method) (Hudzicki, 2016). The results were evaluated in accordance with the drug exposure interpretation table. For the performance of an AMR, the following agents were used on the obtained bacteriological samples at the laboratory: cloxacillin 500 µg (“Bio-Rad”, France) (beta-lactamase-resistant penicillin group), ceftriaxone 30 µg (“Bio-Rad”, France) (third-generation cephalosporin, from cephalosporin group), neomycin 30 IV (“Bio-Rad”, France) and streptomycin 10 µg (“Bio-Rad”, France) (aminoglycoside group), amoxicillin 25 µg (“Bio-Rad”, France) (penicillin group), tetracycline 30 µg (“Bio-Rad”, France) (tetracycline group), sulfamethoxazole/trimethoprim 1.25/23.75 µg (“Bio-Rad”, France) (sulfamide antibiotics), rifampin 5 µg (“Bio-Rad”, France) (rifamycin group), penicillin 6 µg (“Bio-Rad”, Francija) (penicillin group).

Histological examination of biopsies of the uterine endometrium

The cows included in the study underwent uterine cavity biopsy on day 42 postpartum with an original biopsy instrument (*Divisible biopsy instrument* 60 cm, Kruuse, Denmark). During the study, 60 biopsy samples were obtained, which were subjected to histological examination. The biopsy sample was taken from the ventral surface of the dorsal wall of the biggest uterine horn. The sample was obtained from the uterine endometrium. The resulting tissue

samples were immediately placed in a neutral 10% formalin solution at pH 7.5 (Humason, 1967). They were delivered to the laboratory of the Institute of Pathology of P. Stradiņš Clinical University Hospital, where further histological preparation and examination of these samples was performed.

In the histological samples of the uterine endometrium were evaluated changes in pathological processes. According to Rhyaf (2010), Pascottini & Opsomer (2016), Velladurai *et al.* (2017), Alagar *et al.* (2018), we evaluated the tissue pathological process according to the following criteria: 1) epithelial surface delamination in the uterine mucosa, 2) subcutaneous small blood vessels, 3) neutrophil and lymphocyte infiltration in the subepithelial layer, 4) 5) hemosiderin granules (Rhyaf, 2010; Pascottini 2016; Velladurai *et al.*, 2017; Alagar *et al.*, 2018).

In addition to the already mentioned evaluation of histological samples of the uterine mucosa, leukocyte infiltration was also taken into account, which was evaluated at 400x magnification. If 0–29 leukocytes were detected in five representative randomly selected fields of vision with an average area of $71404 \pm 79.06 \mu\text{m}^2$, then this was considered to be normal uterine mucosa up to the degree of mild inflammation. If there were 30–80 inflammatory cells, it was called moderate inflammation, but if there were more than 80 inflammatory cells, it was classified as severe uterine endometritis (Kask & Gustafson, 1998).

Immunohistochemical examination of biopsies of the uterine endometrium

Immunohistochemical examination was only performed to obtain information on whether the animals were in the follicular or luteal phase at the time of biopsy in the oestrous cycle. Pascottini *et al.* (2016) describes that in the pre-heat (*proestrus*) period and post-heat (*metestrus*) period, large amounts of polymorphonuclear cells are infiltrated in the endometrium of the uterus that is a normal physiological process - response to the dominant hormones. This is important to know, when interpreting histological findings regarding subclinical endometritis. Along with the preparation of the histological sample, a sample was also prepared for immunohistochemical examination. 3 μm thick sections of uterine mucosa were obtained and prepared for further immunohistochemical examination. The following primary antibodies were used in the preparation process: anti-oestrogen receptor alpha (mouse monoclonal antibody to human antigen MMAH, clone 1D5, code N 1575, dilution 1: 1); anti-progesterone receptor (mouse monoclonal antibody to human antigen MMAH, clone 1A6, code N 1595, 1: 1 dilution); anti-CD3 detects T cells (T lymphocytes), it is a rabbit polyclonal antibody to human antigen, code A 0452, polyclonal clone, 1:100 dilution. The LSAB2 imaging system, which included a biotinylated secondary antibody-streptavidin complex with peroxidase and 3,3-diaminobenzidine, was used to visualise the bound primary antibody in

accordance with the manufacturer's protocol. The counterstain was provided with haematoxylin for three minutes. After rinsing, the micropreparations were dehydrated and covered with a cover slip. Adequate positive and negative control reactions were used at all stages. The positive structures turned brown.

Oestrogen and progesterone expression were assessed in uterine endometrial surface epithelium, glandular epithelium, and stromal cell nuclei. Concentrations of oestrogen receptors alpha and progesterone receptors in the uterine stroma are highest *during oestrus* (days 0 and 5) and *metoestrus*, but lower during *dioestrus* and *proestrus*. In contrast, in the uterine glandular epithelium, the highest concentration of oestrogen receptors α is on days 0, 5, 9, and 13 of the heat cycle, and the concentration of progesterone receptors is highest on days 0, 5, and 9 of the heat cycle (Martin *et al.*, 2008). CD3 $^{+}$ positive expression during the bovine heat cycle is significantly higher in the *stratum compactum* layer. This CD3 $^{+}$ positive expression is higher in the early and middle luteal phase of the heat cycle, but lower in the follicular phase (Ohta *et al.*, 2013).

In immunohistochemical studies, the relative amount of positive structures (oestrogen receptors α and progesterone receptors) was evaluated by using the semi-quantitative counting method according to Pilmanes *et al.* (1998). The intensity of the positive structures was determined by using the following gradation: (-) there are no positive structures in the high power field; (+) slightly positive structures in the high power field; (++) average number of positive structures in high power field; (+++) large amount of positive structures in the high power field; (++++) very large amount of positive structures in the high power field (Pilmane *et al.*, 1998).

In the statistical data processing, the results obtained by means of the semi-quantitative method were processed as data of the ordinal scale. A total of 56 tissue samples were prepared and analysed for immunohistochemical examination, and the obtained four biopsy samples did not contain sufficient material to be analysed.

The intensity of CD3 $^{+}$ positive structures was determined by using the method recommended by Ohta *et al.* (2013) - evaluated at 200x magnification in at least three representative randomly selected high power fields with an area of 0.1 μm^2 (the average number of CD3 $^{+}$ positive T cells per 0.1 μm^2 of area was counted and calculated). If on average 0-29 lymphocytes (diffuse in the uterine stroma and uterine endometrial surface epithelium) were found in the uterine endometrial samples, this was considered a normal physiological process, but if there were 30 or more lymphocytes, it was evaluated as inflammation.

CALCULATION OF ECONOMIC COSTS

Milk production and the good reproductive performance of cows are the most important in dairy farming and are important contributors to economic viability (Mahnani et al., 2021). Actual economic losses (AEL), expressed in monetary terms, occur as a result of animal diseases, deaths, slaughter (Brūveris, 1987), reduced productivity and reproduction (Brūveris, 1987; Mahnani et al., 2021), and the absence of newborns (Brūveris, 1987). The economic calculations were based on the formulae recommended by Brūveris (1987):

The actual economic losses in the event of **forced animal elimination** have been calculated according to the formula:

$$AEL = A \cdot Sv \cdot C - N$$

A - the number of animals compulsorily slaughtered;

Sv - average live weight of one animal, kg;

C - 1 kg purchase price of live mass, in euro;

N - revenue from marketed production, in euro (Brūveris, 1987).

Actual economic losses due to **reduced animal productivity** after disease are calculated (loss of production coefficient):

$$AEL = PZK \cdot A \cdot C$$

PZK - the coefficient of losses of production;

A - number of sick animals;

C - 1 kg purchase price of live mass, in euro (Brūveris, 1987).

Actual economic losses **comparing productivity** of sick and healthy animals in one herd

$$AEL = (P_1 - P_2) \cdot A \cdot L \cdot C$$

P₁ - average daily productivity of healthy animals, kg;

P₂ - average daily productivity of sick animals during the period of illness, kg;

A - the number of animals who over diseased;

L - the number of days of sickness;

C - 1 kg purchase price, in euro (Brūveris, 1987).

Actual economic losses **without obtaining newborns** in cases of cow sickness:

$$AEL = A \cdot V$$

A - number of unborn calves;

V - value of one newborn calf, euro (Brūveris, 1987).

The value of a newborn calf (VC) of a dairy cow is calculated by:

$$TV = 3.61 \cdot C$$

3.61 - the quantity of milk in centners (cnt) equivalent to the amount of feed needed for the new-born calf for its development;

C - 1 cnt for the purchase price of milk with a basic fat content, in euro (Brūveris, 1987).

To calculate the **total economic losses**, Brūvers (1987) suggests adding to the actual economic costs the veterinary costs of treatment, rehabilitation, and prevention.

STATISTICAL DATA PROCESSING

Descriptive statistics (averages and standard error) of *MS Excel* were used for statistical data processing. Nonparametric ANOVA method, the **Kruskal-Wallis test** was used to analyse body temperature in study cows; blood morphological parameters on days 14, 22 and 28 PP; progesterone parameters; days open to the first service; services per pregnancy; days open. If the test demonstrated significant differences between groups, then the **Mann-Whitney test** was used to determine the groups that this significant difference was detected between.

Z-test was used to compare the proportions in 2 samples: for the comparative evaluation of offspring; for the evaluation of calving time; for the assessment of uterine involution and the amount of fluid detected therein; for the evaluation of the percentage of inactive ovaries; for the evaluation of the percentage of microorganisms between days 2, 14 and 42 PP; for the assessment of the severity of uterine inflammation and subclinical endometritis; for the evaluation of the percentage of inseminated cows and the percentage of first service conception; for the evaluation of the percentage of pregnant cows for up to 100 of 200 days PP.

Meanwhile, the **t-Test** was used: two-sample assuming unequal variances: for the evaluation of the duration of pregnancy, dry period duration, assessment of age and ordinal number of lactation, as well as for the analysis of biochemical and haematological parameters 48 hours PP.

Stata IC software 12.1 (StataCorp LP, 4905 Lakeway Drive, College Station TX77845, USA, Stata IC version 12.1 for Windows) was used to evaluate the effect of RFM treatment on milk yield (MY) and SCC (which converted to logarithmic somatic cell scores (SCS)) on days 30, 100, and 305 PP and displayed for each group as a mean \pm SEM. Differences between current and previous lactation MY₃₀, MY₁₀₀, MY₃₀₅, SCS₃₀, SCS₁₀₀, and SCS₃₀₅ were analysed using a **Wilcoxon matched-pairs signed-rank test**. **Linear multiple regression** (Multivariable analyses) were performed to assess the RFM

treatment's impact on the all above mentioned MY and SCS. Multivariate regression analyses of variance (MANOVA) were performed to assess the impact of DPL on the all above mentioned MY and SCS. All effects were corrected for herd influence. Differences were considered significant if $p < 0.05$ (Arhipova & Bălița, 2003; Teibe, 2007; Krastiš & Ciemiņa 2003), (<http://epitools.ausvet.com.au/content.php?page=StatisticsHome>).

RESEARCH RESULTS AND DISCUSSION

Results of rectal and ultrasonographic examination of the uterus and ovaries of the cows

We performed rectal and ultrasonographic examination of the uterus and ovaries in all cows involved in the study. Upon the ultrasonographic examination of the cow's uterus on days 14, 22, 28 and 42 PP, along with the decrease in the uterine size of the cows, the amount of fluid in the uterus also decreased. In our study, complete uterine involution and uterine mucosal regeneration in control group cows (group 1 cows) occurred on day 28 PP (upon rectal examination, the uterus is small, no anechogenic areas were found in the uterine cavity upon ultrasonographic examination). In contrast, in cows with RFM, similar recovery was only observed after day 42 PP. Some authors believe that if fluid is no longer observed in the uterus, the uterine mucosa has recovered, which, on average, occurs within 31–36 days PP (Rao Chalapati & Rao Ramamohana, 1980; Prasad & Krishna, 2009), or from day 26 to 52 PP (Noakes *et al.*, 2001; Drillich *et al.*, 2005; LeBlanc, 2008).

There are differing opinions regarding the resumption of cyclic ovarian activity in cows after calving. In our study, the cyclic ovarian activity resumed on around day 18 and 22 PP in both the control group and RFM group cows. 17 days PP has been reported in the literature (Saiduddin *et al.*, 1967); or 30–33 days PP (Buch, Tyler & Casida, 1955; Morrow, Roberts, & McEntee, 1969) as well as even only around day 76 PP (Morrow, 1986; Elmetwally, 2018). Tucho and Ahmed (2017) indicate that RFM delays the resumption of normal ovarian cyclic activity, although this statement was not confirmed in our study. Bekana, Jonsson, and Kindahl (1996; 1997) also found in their studies that RFM and subsequent endometritis were not the cause of impaired ovarian activity, which is consistent with the findings of our study.

In each group, on days 8 and 21 postpartum, a subset of cows were injected with synthetic PGF_{2α} - cloprostenol (as sodium salt) 500 µg/animal per injection to test whether it promotes better ovarian function, uterine involution, reduces the risk of uterine inflammation and improves the occurrence of pregnancy. No statistically significant differences in uterine size between cows that received the injection of PGF_{2α} on days 8 and 21 PP and those that did not

was observed ($p>0.05$). Hirsbrunner *et al.* (2006) also notes that, when cows were injected with PGF_{2α} twice, no significant differences between the groups that received and did not receive PGF_{2α} were observed. Although some authors report that the use of PGF_{2α} injections after parturition in the early PP period improves the contractions of uterine myometrium and the uterus decreases in volume more rapidly (Hirsbrunner, 2003; Melendez *et al.*, 2004). Szenci (2016) reports that *in vitro* studies demonstrated that placentomes of cows with RFM produced less PGF_{2α} and more prostaglandin E (PGE) than in cows without RFM. Thus, the injection of PGF_{2α} one hour after parturition and then in 12 h PP could result in a fast separation of the fetal membranes and improve the natural defence mechanisms of the uterus. Villeneuve *et al.* (1988) indicate that, after PGF_{2α} injection, ovarian cyclic activity resumes faster. This statement was not confirmed in our study - no significant differences were observed between cows injected with PGF_{2α} and the cows that were not injected.

Results of blood morphological and biochemical parameters in cows with and without fetal membrane retention

Morphological and biochemical parameters of blood between cows whose fetal membrane was detached within 24 hours after delivery (control group) and cows with fetal membrane retention were compared. Haematological test samples were obtained on day 2, days 14, 24 and 28 PP, and biochemical test samples were collected on day 2 PP. Morphological blood parameters in cows with and without foetal cover retention on the second day after parturition are shown in Table 3.

The analysis of the haematological parameters in cows on the second day after birth shows that the control group of cows had an increased white blood cell (WBC) count (13.94 ± 1.59 ($\times 10^9/L$)) at the expense of leukocytes with segmented nuclei (7.81 ± 1.13 ($\times 10^9/L$)), but the WBC levels demonstrated in cows with RFM fell within the physiological range of values - 9.09 ± 0.76 ($\times 10^9/L$) ($p<0.05$). The number of monocytes also significantly exceeded the limits of physiological norm in control group cows (1.52 ± 0.21 ($\times 10^9/L$)) and was significantly higher than in cows with RFM (0.82 ± 0.18 ($\times 10^9/L$)) ($p<0.05$).

Normal delivery causes stress in the animal, resulting in a significant increase in WBC count with a slight shift to the left (Schalm *et al.*, 1975; Jain, 1986), which is also confirmed in the control group cows of our study. However, in our study, the tests performed on day 2 PP in cows with RFM demonstrated that the levels of WBC, erythrocytes, haemoglobin, and haematocrit were within physiologically normal ranges, although they are elevated for 12–24 h PP during normal parturition and then a decrease occurs within the next few days (Schalm *et al.*, 1975; Jain, 1986). Schalm *et al.* (1975), Jain (1986). Stockham and Scott (2008) indicate that elevated band neutrophils

counts in cows with RFM is a response to acute inflammation. Kimura *et al.* (2002), Beagley *et al.* (2010) find that cows with RFM have significantly lower neutrophil WBC counts before birth than cows without RFM, which lasts for 1–2 weeks after parturition, which was also confirmed in our study.

On the fourteenth day after calving, the WBC deviation to the left in the groups of cows persisted, thus, the number of band neutrophils increased, which, tended to decrease compared to the second postpartum day. On the twenty-second day after birth, the number of band neutrophils in cows remained elevated (deviation to the left), moreover, it was significantly higher in cows with RFM ($p<0.05$). Also on day 28, leukocyte deviation to the left was still present in the PP cow groups, although these parameters continued to normalise and approach the ranges of the physiological norm.

Blood chemistry tests in cows with RFM showed a significantly higher amount of total and direct bilirubin compared to control group cows, whose fetal membranes were separated within 24 hours ($p<0.05$) (Table 4).

This could point to a cholestatic process that took place in liver cells in association with intrahepatic cholestasis, which could be caused by fatty liver degeneration. Blood cholesterol levels in the cows included in the study were also below the physiological norm, which points to liver problems (possible fatty liver disease), as confirmed in the studies of Liepa (2000) as well. The low albumin/globulin ratio in cows with RFM points to inflammatory processes in the body. Liepa (2000) indicates that the albumin/globulin ratio may also increase a few days before and a few days after calving, as it is involved in colostrum formation, but it may also decrease in the event of liver disease and acute inflammation.

Blood samples were taken on certain days after delivery (days 2, 4, 6, 14, 16, 18, 22, 24, 26, 28, 30, 32 and 42), to determine the level of progesterone in the blood serum, which provided further information on the functional status of the ovaries. In our study, after parturition in all groups of cows, blood P₄ levels began to increase on around days 18 and 22 (Fig. 1), indicating that ovulation in the ovaries occurred approximately 3 days before, as also described by Kask *et al.* (1999). Although there were no statistically significant differences in serum P₄ levels between RFM group cows during the study ($p>0.05$), serum P₄ levels were higher in cows with RFM than in control group cows, which is mainly confirmed in studies by Kaczmarowski *et al.* (2006) and Ali *et al.* (2009). Ali *et al.* (2009) suggest that elevated P₄ levels in cows with RFM may be related to the inability of the placenta to produce specific steroid enzymes that aid in P₄ metabolism and estrogen formation, which in turn may lead to the accumulation of immunosuppressive proteins in the uterine lumen and make the uterus susceptible to infections.

Evaluation of microbiological examinations of uterine cavity content in cows with and without fetal membrane retention

The uterine cavity after birth can contain aerobic and anaerobic, gram-positive and gram-negative bacteria. On the second PP day of our study, uterine cavity contamination was detected in 98% of cows, and on day 14 PP it was observed in 91% of cases. This is consistent with De Boer *et al.* (2014), where in 90% of cases contamination of various types of microorganisms in the uterine cavity was reported in cows in the first two weeks after the parturition; similar findings are also described by Knudsen *et al.* (2016). Knudsen *et al.* (2016) also indicate that within 8 weeks after delivery, the uterine cavity becomes sterile again due to uterine involution. A similar trend was observed in our study as well (Figures 2, 3 and 4).

In the study of the doctoral thesis, the bacteria were in the form of both monocultures and mixed cultures, where the facultative anaerobic microorganisms *Escherichia coli*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, the aerobic bacterium *Corynebacterium spp.* and the required anaerobic bacterium *Clostridium spp.* were found in both the control group cows and cows with RFM. It should be noted that *E. coli* was most commonly detected in Group 2 cows (where retained fetal membranes were removed manually and animals were treated with IU bolus) that were injected with PGF2 α . Also, the highest number of *Streptococcus spp.* and *Clostridia spp.* cases were detected in Group 2 cows on day 42 PP. It has been reported in the literature that in several studies the most common microorganisms in the uterine cavity were the facultative anaerobic pathogens *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes*, *Streptococcus spp.* (Bekana *et al.*, 1994; Huszenicza *et al.*, 1999; Sheldon *et al.*, 2006; Azawi, Rahawy & Hadad, 2008), *Staphylococcus spp.*, aerobic bacteria *Bacillus spp.* and *Pseudomonas spp.*, as well as required anaerobic bacteria *Fusobacterium necrophorum*, *Prevotella spp.*, *Bacteroides spp.* (Huszenicza *et al.*, 1999; Sheldon & Dobson, 2004; Azawi, Rahawy & Hadad, 2008; Moore *et al.*, 2019) and *Clostridium spp.* (Sheldon & Dobson, 2004).

Most of the cows in the study did not develop uterine inflammations after delivery, both in the control group as well as among the cows with RFM. Földi *et al.* (2006) report in their article that PP presence of bacteria in the uterus of cows (bacterial contamination) does not always cause inflammation of the uterus or clinical general disease. It depends on the immune system of the animal. Uterine involution can be considered as a “visible balance” where physiological uterine self-defence mechanisms are able to neutralise bacterial contamination (Földi *et al.*, 2006).

In our study, metritis was detected in 13% of cows in the control group (Fig. 5) but in cows with fetal membrane retention in 14% of cases. Antibiotics containing penicillin and ceftiofur were used to treat metritis. In turn,

endometritis was detected in 13% of cases in the control group and cows with RFM in 29% of cases. In contrast, subclinical endometritis was present in 33% of control cows and 42% of cows with RFM. Cows with RFM are at higher risk of developing metritis in 15–20% of cases (Callahan, 1987; Kónyves 2009; Dubuc, 2011; Gilbert, 2018) and endometritis in 5–92% of cases (Borsberry & Dobson, 1989; Van Werven, 1992; Brooks, 2000; Potter *et al.*, 2010; Sarder *et al.*, 2010; Gilbert, 2018) than other cows. Once metritis has been diagnosed, timely systemic antibiotic therapy is recommended. Penicillin or ceftiofur antibiotics (Smith *et al.*, 1998) or tetracycline-containing antibiotics (Schmitt *et al.*, 2001) administered intramuscularly or subcutaneously are more commonly chosen.

The performance of antibiogram in the samples obtained during the study from the uterine cavity of the cows, allowed the identification of antibiotics that had an optimal effect for the performance of successful *intra uterine* (IU) treatment of animals. However, it was only possible to obtain a response from the laboratory about the results after two weeks of sample submission at the earliest. Therefore, the decision was made to use 350,000 IU of neomycin sulphate in combination with 500 mg oxytetracycline hydrochloride for IU treatment. At low concentrations, neomycin has a bacteriostatic effect (interferes with the synthesis of proteins in the cells of microorganisms), at high doses - a bactericidal effect (damages the cytoplasmic membranes of bacterial cells). In contrast, tetracyclines act on bacterial ribosomes, where they inhibit protein synthesis. Tetracyclines are more active against the microorganisms that are in the reproductive phase (Purviňš, 1997). Although neomycin was supposed to be effective against most of the bacteria we had isolated during the study, it was not. The results of the antibiogram showed that *E.coli*, *Staphylococcus spp.*, Group G beta haemolytic streptococci, *Corynebacterium spp.*, *Klebsiella spp.*, *Tryperella pyogenes*, were sensitive to it, but it was ineffective in other cases. In contrast, *Clostridium spp.*, *Staphylococcus spp.*, *E. coli*, *Streptococcus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Acinetobacter Iwoffii* and *Aerococcus urinae* were sensitive or partially sensitive to tetracycline.

Results of histological examination of the uterus in cows with and without fetal membrane retention

Uterine mucosa samples were obtained on day 42 postpartum in order to determine the condition of the uterine mucosa of the cows included in the study. In some cows on around day 42 PP, the uterine mucosa was not yet 100% recovered. In cases of inflammation and on certain days of the heat cycle (determined by the immunohistochemistry method), we detected a lot of neutrophils among the epithelial cells. In the compact layer (subepithelial) of

the functional layer of the endometrium, there were mononuclear cells and neutrophils among the cells, which pointed to the presence of chronic inflammation. Similar histological findings of varying severity were found in cases of chronic inflammation in biopsy samples of cows with and without RFM. Chronic uterine inflammation was characterised by the presence of eosinophil WBC, thick, sclerotic walls of arterioles, connective tissue cell proliferation, and development of lymphocytic follicles. We also detected macrofocal chronic inflammation in the uterine stroma with fibrous and vascular proliferation. Large-scale chronic inflammatory infiltrates consisted mainly of lymphocytes and plasma cells with the presence of eosinophil WBC in the mucosa. Focal lymphocyte infiltration was also observed. The glandular mucosa was lined with cylindrical epithelium. Desquamated epithelium and some inflammatory cells were found in their lumen. Supposedly hyperplastic groups of glands formed in the fibrous stroma with groups of cells of chronic inflammation. Haemosiderin granules were also occasionally detected in histological samples. Individual lymphatic aggregations of follicular mononuclear cells were found on the border with glands. Lymphatic follicles even had a reproductive center. All of these changes of chronic inflammation of the uterine mucosa have also been found in the studies by Pascottini and Opsomer (2016), as well as Rhyaf (2010).

On average, six weeks after delivery, between days 34 and 47 PP, subclinical endometritis may develop in the uterus (Thatcher *et al.*, 2006) and, as noted by Opsomer (2015), in the event of subclinical endometritis, no clinical signs of endometritis are detected (purulent or mucopurulent secretions). Pascottini *et al.* (2016) proved that histological examinations of the uterine mucosa are more likely and more accurate in detecting subclinical endometritis. It is a more sensitive method than *in vivo* or *ex vivo* cytology. Biopsy samples of all cows with chronic inflammation in our study were found to have similar histological findings, but with varying degrees of severity: mild to moderate inflammation. These inflammations were subclinical endometritis. We considered subclinical endometritis to exist, if there were no clinical signs of uterine inflammation, but histological chronic inflammatory infiltrates were detected in the sub-epithelial layer of the uterus - lymphocytes and lymphocytic aggregates, macrophages, plasma cells, eosinophil WBC, separate round lymphatic follicles. Granules of haemosiderin were also visible in the subepithelial layer and stroma.

The examinations demonstrated that the histological condition of the endometrium of 40% of the second group, 40% of the fourth group and 47% of the third group of cows were consistent with subclinical endometritis, as presented in Figure 6. Histological endometrial changes were observed in 33% of cases of control group cows, which differed significantly from the results of RFM cows ($p<0.05$). Subclinical endometritis is characterised by the reduction

of pregnancy, an increase in the number of days open to the first service, and an extension of the days open (Dubuc, 2011; Pascottini *et al.*, 2016).

Results of immunohistological examination of the uterus in cows with and without fetal membrane retention

The uterus is the target organ for ovarian steroid hormones. Oestrogen receptors alpha, progesterone receptors and CD3⁺ receptors on the surface of T lymphocytes on day 42 PP were detected by means of the immunohistochemical method in the uterine endometrium. Each of these receptors indicated which phase of the heat cycle that the study animal was in (follicular or luteal phase). This information was also important for the accurate interpretation of histological examinations, as polymorphonuclear cells in the uterine endometrium are increasingly infiltrated at certain times during the oestrus cycle.

Positive expression of progesterone receptors (PR), oestrogen receptors (ER) alpha in epithelial cell nuclei of the uterine mucosa, glandular epithelial cell nuclei and stromal cells, as assessed by a semiquantitative method, ranged from 'single' to 'very frequent' in the research cows. The concentration of ER α and PR in the uterine stroma is highest during the oestrus cycle (days 0 and 5) and lowest during the luteal phase. In contrast, in the uterine glandular epithelium, the highest concentration of ER α is on days 0, 5, 9, and 13 during the heat cycle, and the concentration of PR is highest on days 0, 5, and 9 (Martin *et al.*, 2008). Meanwhile, CD3⁺ positive expression during the bovine oestrus cycle is significantly higher in the *stratum compactum* layer. This CD3⁺ positive expression is higher in the early and middle luteal phase of the heat cycle, but lower in the follicular phase (Ohta *et al.*, 2013) which was also confirmed in our study. However, in terms of CD3⁺ positive expression, 47% of cows in which retained fetal membranes were not removed and treated IU had this CD3⁺ positive expression in the form of lymphocytic aggregates or had an average of more than 30 lymphocytes per 0.1 μm² area, indicating subclinical endometritis. In contrast, in the other groups of cows with RFM, CD3⁺ positive expression, which indicated subclinical endometritis, was lower (40% of cases).

Effect of fetal membrane retention treatment methods on subsequent lactation

During the analysis of the effect of different RFM treatment methods on subsequent lactation by using the amount of milk and SCC, no significant difference was observed between the studied groups of cows in the first 30 days

PP, which was also confirmed by Drillich *et al.* (2007), however, in economic terms severe losses were observed, which can be seen in Table 5.

During the study, the average production cost in herds to produce 1 kilogram of milk was 0.24 euro, but the average purchase price of milk was 0.27 euro. Consequently, the total loss per each kilogram of milk not obtained was 0.51 euro. The comparison of the current lactation of each cow that has given multiple births with the previous lactation, and the comparison of the RFM cow groups with the control group (group 1) cows demonstrated that the highest milk yield decrease was registered in Group 2 of cows, where fetal membranes were removed manually and animals were treated with IU bolus (112.91 ± 91.86 kg, respectively), (Table 5).

But in the first 100 days PP, upon the comparison of the current lactation of each cow that has given multiple births with the previous lactation, and the comparison of the RFM cow groups with the control group (Group 1), the highest decrease of milk yield was received for Group 2 cows (372.98 ± 255.81 kg, respectively), as well as for group 4 cows (239.75 ± 271.86 kg, respectively). In contrast, in Group 3 of cows, this trend was weakly pronounced.

Some authors indicate that milk yield in subsequent lactation in cows with RFM is significantly lower than in healthy cows (Hossein-Zadeh & Ardalan, 2011; Islam *et al.*, 2012; Tucho & Ahmed, 2017). However, Van Werven *et al.* (1992) indicate that only in cows that have given multiple births, did RFM significantly reduce milk yield during lactation. In contrast, Goshen and Shpigel (2006), in their studies, found that both primiparous cows and multiparous cows with RFM produced 300–500 kg less milk in standard lactation than other animals of the herd. The highest milk loss in cows with RFM are registered in the first 4 weeks PP (Lucey *et al.*, 1986)

Effect of fetal membrane retention treatment methods on reproduction parameters in cows

When evaluating reproduction rates as a whole, the results obtained were ambiguous. Reproduction results are shown in Table 6. Although, days open to the first service, there were differences between Group 1 cows (control) and cows with RFM, they were not significant ($p>0.05$). Patel *et al.* (2016) reports that manual removal of retained fetal membranes increases the time from calving to the first instance of heat by 20 days compared to other treatments. This occurs because manual removal of the fetal membranes results in minor damage to the uterine endometrium, which, in turn, reduces phagocytic activity and neutrophil WBC counts in the blood, thus reducing local and general resistance to infections. When evaluating the effect of PGF_{2α} on the days open to the first service in our study, the number of days decreased in all groups of cows studied. However, it had no significant effect ($p>0.05$). Up to 100 days

PP, 73% of cows in the control group and 64% of cows in the second group were artificially inseminated, which differed significantly ($p<0.05$) from the cows in groups 3 and 4 (43% and 31%, respectively), (see Table 6). When evaluating the effect of PGF_{2α} on the number of artificially inseminated cows up to 100 days PP, significantly better results were obtained for Group 4 cows, where RFM was not separated and IU treatment was not applied (respectively, in cows with the PGF_{2α} injection, 50% of animals were artificially inseminated within up to 100 days PP, while without the PGF_{2α} injection - 14%) ($p<0.05$). In contrast, in other groups of cows, the results were worse in cows that received a PGF_{2α} injection.

When evaluating the number of inseminations of cows until pregnancy occurs, or services per pregnancy, the optimal result was only observed for Group 2 cows (respectively, 1.75 ± 0.37 times). Although Rokde *et al.* (2017) indicate that the insemination index is significantly higher for cows with RFM than for control group cows (2.39 ± 0.14 versus 1.33 ± 0.07 , respectively). Similarly, Hossain *et al.* (2015) report that the insemination index of cows with RFM was 2.89 ± 0.78 times. When evaluating the percentage of the first service conception in our study, Group 4 cows demonstrated relatively better results (38%), although days open for them was among the longest (160 ± 25.03 days).

The highest percentage of pregnant cows up to 150 days PP is observed in the second group - 43%. The second highest result was for group 4 cows (38%). Significant differences were only observed between cows of groups 2 and 3 (43% vs. 29%) ($p<0.05$). When evaluating the effect of PGF_{2α} on the pregnancy of cows up to 150 days PP, significantly better results were obtained for Group 4 cows, where RFM was not separated and IU treatment was not applied (respectively, in cows with the PGF_{2α} injection, 67% of animals became pregnant within up to 150 days PP, while without the PGF_{2α} injection - 11%) ($p<0.05$). The cows of Group 1 and Group 3 that received the PGF_{2α} injection had significantly worse gestational outcomes up to 150 days PP (25% for Group 1 cows with the PGF_{2α} injection and 43% for cows without the PGF_{2α} injection ($p<0.05$), while in Group 3, 20% for cows with the PGF_{2α} injection and 40% for cows without the PGF_{2α} injection ($p<0.05$)). For all cows of the study, percentage of pregnant cows up to 200 days PP ranged from 40 to 50%, and there were no significant differences between cows that had or had not received the PGF_{2α} injections.

When evaluating days open, the shortest days open among cow groups with RFM was for Group 2 cows (126 ± 18.08 days), the longest - in Group 4 cows (160 ± 25.03 days) ($p>0.05$). Hossain *et al.* (2015) reports that in cows with RFM, the days open period is 108.45 ± 9.34 days. Djuricic *et al.* (2011) found that manual removal of retained fetal membranes prolongs the days open period. When evaluating the effect of PGF_{2α} on the days open period, it should be noted that the results of PGF_{2α} use in our study were worse in all groups, except for Group 4 cows.

When assessing the reproduction of cows, it is also important to know the number of culled cows in the herd and the reasons for the culling thereof. For a variety of reasons (infertility, anoestrus, severe mastitis, ruptured teat tip, abomasal dislocation, dilatation of the caecum, hoof problems (lameness), fatty liver disease), a total of 23 cows out of 60 were culled during the current lactation. In the control group, 4 cows were culled (27%, the average age of cows was 3.25 ± 0.48 years and 2.25 ± 0.48 lactations), in the second and third groups 7 cows in each (47%), but in the fourth group - 5 cows (33%). The average age of cows with RFM was 3.94 ± 0.45 years and 2.89 ± 0.44 lactations. There were significantly more culled cows in the second and third group of cows than in the control group (group 1) and in the fourth group of cows ($p<0.05$). Dubuc *et al.* (2011) state in their review that some uterine diseases pose an increased risk of animal culling, for instance, metritis and RFM, where the risk exists in the early lactation phase (30 days PP) or in the late lactation phase (around 300 days PP). Beagley *et al.* (2010) suggest that not only uterine diseases may be a cause for animal culling in the event of RFM, but it may also be due to another postpartum disease combined with RFM.

ECONOMIC COSTS FOR DIFFERENT TREATMENT METHODS FOR FETAL MEMBRANE RETENTION

The retention of fetal membranes causes economic losses to farms both in the form of unobtained milk and in the form of reduced, poor reproduction and, consequently, in the absence of one offspring per year, and in the form of various other diseases resulting from RFM. The fact that there may be RFM for cows, are shown by a number of factors before and after delivery. For example, the duration of pregnancy in cows. The duration of pregnancy in cows may affect the future lactation and reproduction of the animal. Prolonged or shortened thereof can result in fetal membrane retention (Han & Kim, 2005; Shenavai *et al.*, 2010; Hossein-Zadeh & Ardalan, 2011; Hossain *et al.*, 2015). In our study, the duration of gestation in the cows of the control group was 281.40 ± 1.37 days, which falls within the normal physiological range, while in cows with RFM it was significantly shorter (273.18 ± 1.03 days) ($p<0.05$).

The duration of the dry period in cows may affect the post-partum period of the animal. Watters (2008), with his group of scientists, points out that a reduced dry period can cause fetal membrane retention. To find this out we evaluated the duration of the dry period (DP) in the animals involved in the study (cows that gave birth more than once) ($n = 42$) *post factum*. As heifers ($n = 18$) do not have a dry period, they were not included in the calculations. In the cows of the control group, where the fetal membranes were separated within 24 h PP, the mean duration of the DP was 66 ± 4.8 days (57–101 days). By contrast, in cows with RFM the average duration of DP as a whole was 58 ± 3.7 days. It

was divided into: shortened DP – on average it amounted to 30 ± 5.2 days (4–46 days); traditional DP – on average it was 63 ± 1.6 days (47–70 days); prolonged DP - on average amounted to 79 ± 4.5 days (71–108 days). In cows with RFM, the percentage of shortened and prolonged DP was 54%, while the traditional DP occurred in 46% of cases. There were no statistically significant differences in the duration of DP, however, the occurrence of RFM was more frequent after a shortened or prolonged dry period ($p>0.05$). Curtis *et al.* (1985) and Santschi *et al.* (2011) found that older cows develop RFM as a result of a shortened dry period. Although Coppock *et al.* (1974) do not see a relationship between the length of the dry period and RFM, data of this study were obtained more than 30 years ago and the productivity of cows was much lower at that time (Watters *et al.*, 2008).

RFM can also be caused by the sex of offspring, number of offspring and the fact of them being born alive or dead. In our study, the composition of the control group of cows was characterised by delivering a higher number of heifers - 9 (56%), fewer bulls - 5 (31%) and in one case - twins (13%). In contrast, in the groups of cows with RFM, the offspring was dominated by bulls - 23 (40%) ($p>0.05$) and significantly fewer heifers - 14 (25%) ($p<0.05$), as well as the number of twins - 8 (28%) and stillborn calves - 4 (7%) was statistically significantly higher ($p<0.05$). This is also confirmed by other studies of the authors, which indicate that RFM occurs more commonly after the birth of twins, bulls, stillborn calves in difficult births (LeBlanc, 2007; Gaafar *et al.*, 2010; Hossein-Zadeh & Ardalan, 2011; Islam *et al.*, 2012; Tucho & Ahmed, 2017).

The age and lactation number of cows can also serve as a cause of RFM. In our study, the mean age of control group cows was 3.33 ± 0.35 years, but for cows with RFM - 4.10 ± 0.27 years ($p>0.05$). The mean ordinal number of lactation in control group cows was 2.13 ± 0.32 , in cows with RFM - 2.91 ± 0.26 lactations ($p>0.05$). Studies by other authors also confirm that RFM is more common in older cows with higher lactation numbers, especially in hot summers (Curtis *et al.*, 1985; Shenavai *et al.*, 2010; Hossein-Zadeh & Ardalan, 2011; Hossain *et al.*, 2015; Tucho & Ahmed, 2017). Other authors also confirm that as the age of cows increases and the number of lactations increases, the percentage of cows with RFM also increases (Saloniemi *et al.*, 1986; Stevenson & Call, 1988; Sarder *et al.*, 2010; Gaafar *et al.*, 2010; Azad, 2010; Islam *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2017). However, several authors point out that not only the age of cows influences the development of RFM, but also the season, when the animals gave birth (Deyab, 2000; Gabr *et al.*, 2005; Gaafar *et al.*, 2010; Hossain *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2017). In our study, significantly more cases of RFM developed in cows that gave birth in summer and autumn (42% and 29%, respectively) than in winter and spring (16% and 13%, respectively) ($p < 0.05$). Deyab (2000), Gabr *et al.* (2005), Gaafar *et al.* (2010), Hossain *et al.* (2015), Sharma *et al.* (2017) have also found in their studies that RFM occurs more

frequently, when cows give birth in spring and summer, which is partly consistent with our study results.

When evaluating economic indicators, the results are ambiguous (see Table 7). In order to calculate and prove which of the RFM treatment methods has caused less economic losses in our study, we used formulas that calculate the actual economic losses (AEL).

The actual economic losses in the case of forced animal elimination was less in the cow group, where the RFM were not removed and the animals were not treated IU, as the number of culled animals in this group was lower than in the other two groups with RFM. However, lower AEL about unobtained milk and lower number of unborn calves during the year were in cows where the RFM were not removed, but the IU used antimicrobials (€ 99.64 and € 712.06, respectively). In contrast, for cows for which RFM were removed manually and treated IU, the AEL had the highest losses about not obtained milk (€ 2282.63, respectively).

Veterinary costs derived from medicines used to treat RFM, veterinary work, work of a worker who measured the temperature and observed the animals on a daily basis, treatment of other diseases caused by RFM (metritis, endometritis), and preventive measures to avoid various metabolic diseases that may result from RFM. All these costs constituted veterinary costs and were the lowest for the third group of cows, where the RFM were not removed, and the animals were treated IU (€ 300, respectively).

When assessing all economic losses in general, the lowest those were for third group cows, where the RFM were not removed and the animals were treated IU (€ 1391.70, respectively), while the most economic losses were for second group cows, where the RFM were removed manually and the animals were treated IU (€ 3939.86, respectively).

In calculating the actual economic losses, we followed the guidelines recommended by Brüveris (1987) for the models developed in the economic science of veterinary work, which focused on these AEL - forced animal elimination, unobtained milk, unborn calves during the year, and veterinary costs. In contrast, Mahnani et al. (2021) offer a different formula for calculating the economic costs of RFM (Euro/lactation) = $\frac{1}{4}$ of the reduced costs of milk production + the loss associated with the milk restriction for human consumption during the RFM treatment process + replacement costs (early slaughter of the animal) + impaired fertility costs (reduced fertility) + veterinary and treatment costs + labor costs.

The purchase price of raw milk in Latvia is not permanent. They can range up to 23%. During the study, from 2007 to January 2009, the purchase prices of raw milk ranged from 0.24 - 0.34 euros/kg, on average it was 27.00 euros/kg. The production cost in the herds during the study period was 0.24 euros/kg of produced milk. At present, the purchase price of raw milk in Latvia varies from 0.34 - 0.36 euros/kg (Agricultural Data Centre Republic of Latvia

database, registers). Production costs, which consist of variable and permanent costs, currently for large dairy farms in Latvia range from 0.26 to 0.30 euros/kg of produced milk (data compiled by the Latvian Rural Advisory and Training Centre). Although production prices and milk purchase prices have risen by a few cents, the data obtained in our study are up-to-date and not outdated.

CONCLUSIONS

1. Regardless of the method of treatment for the removal of fetal membranes selected, in cows with fetal membranes retention, complete uterine involution had occurred 14 days later than in the control group. The cyclical activity of ovarian function in the study cows was restored on day 15 and 18 postpartum. As evidenced by an increase in progesterone serum levels on days 18 and 22 following parturition, and there were no significant differences between groups of cows with fetal membrane retention.
2. On the second day after parturition, WBC deviation to the left with a tendency to return to normal within 6 weeks. In the third week after parturition, the number of band cells in cows with fetal membrane retention was increased, which points to the actualization of inflammatory processes during this period. Biochemical blood parameters in cows with and without the retention of fetal membranes, pointed to the presence of hepatic disorders - intrahepatic biliary drainage disorders.
3. *Escherichia coli*, *Streptococcus spp.*, *Clostridium spp.* microorganisms were the most common microorganisms found during bacteriological examinations of the uterine cavity, which significantly decreased within 42 days postpartum in cows with the retention of fetal membranes and without it. The lowest number of microorganisms species was found in cows where retained fetal membranes were not removed and animals were not treated IU.
4. Histological examination of the uterine endometrium on day 42 postpartum resulted in lymphocytes and lymphocyte aggregations, macrophages, plasma cells, eosinophils, and haemosiderin granules, which points to subclinical endometritis, in 40-47% of cows with fetal membranes retention irrespective of the selected method of treatment. It was more pronounced in cows, in which the retained fetal membranes were not removed and the animals received IU treatment.
5. Using the immunohistochemical method to determine the positive expression of CD3⁺ in the uterine endometrium, it was possible to differentiate subclinical endometritis from physiological lymphocyte infiltration in the membranes of the bovine uterus during the various phases

of the oestrus cycle, because elevated blood estrogen levels caused active migration of neutrophils in the uterus, which in turn increased phagocytosis and the bactericidal activity in the uterus.

6. When evaluating the effect of different RFM treatment methods on subsequent lactation, no significant difference in milk yield was observed between groups of cows. However, economically, the highest decrease of milk yield in the first 100 days after parturition and the highest number of somatic cell count in standard lactation was registered in cows, in which the fetal membranes were removed manually and IU treatment was provided.
7. The effect of the methods of treatment of fetal membrane retention on the reproductive performance of cows was different, as there were no better or worse outcomes registered for any particular type of treatment. Significantly more inseminated cows up to 100 days PP were registered among cows, in which fetal membranes were removed manually and animals received IU treatment. However, a significantly higher the first service conception and a significantly lower number of culled cows were in the group of cows where the RFM was not removed manually and the animal did not receive IU treatment.
8. In our study, economically better results were shown by a group of cows, where the retained fetal membranes are not removed, and the animals are treated with IU boluses.

RECOMMENDATIONS FOR PRACTICE

1. After the initiation of treatment for retention of the fetal membranes, the animal should be observed for 14 days after parturition, by recording the changes in the body temperature of the cows and the nature of the discharge from the birth canal. Especially if the choice is made in favour of non-separation of the fetal membrane and non-administration of IU treatment to ensure that metritis does not develop.
2. Manual separation of fetal membranes should only be chosen if the fetal membranes can be easily separated from the caruncles. First, attempt to separate fetal membranes from 2-3 caruncles, if they are easily separated, then continue. If they do not separate easily, stop this procedure and choose another method for the treatment of fetal membrane retention.
3. In order to provide better treatment of inflammation of the uterine cavity after the retention of the fetal membranes, it would be advisable to perform random microbiological examinations and antibiograms of the contents of the uterine cavity.

SCIENTIFIC PUBLICATIONS AND THESES

1. Skuja, S., Antāne, V., Lūsis, I. (2021). *Effects of retained fetal membranes treatments and dry period length on the subsequent lactation in cows - milk yield and somatic cell count.* Agronomy Research, 19(1), 265–275, 2021. DOI: <https://doi.org/10.15159/AR.20.242> **Scopus and Web of Science database.**
2. Skuja, S., Antāne V. (2017). *Effects of the treatment method of reproductive performance in cows with retention of fetal membranes.* Rural Sustainability Research. Warsaw: De Gruyter Open, 2017. Vol. 38(333), 14.-23. DOI: <https://doi.org/10.1515/plua-2017-0008>
3. Skuja, S., Antāne, V. (2010). *Postpartum serum biochemical and haematological changes in cows with and without retained fetal membranes.* Research for rural development 2010: annual 16th international scientific conference proceedings, Jelgava, 19-21 May 2010 / Latvia University of Agriculture. Jelgava LLU, 2010. Vol.2, 6.-11. **Scopus and Web of Science database.**
4. Skuja, S., Antāne, V. (2012). *Comparison of progesterone levels and reproductive performance in dairy cows with and without retained fetal membranes.* "Animals. Health. Food Hygiene": Conference "Topical Issues in Veterinary Medicine Science and Practice", Jelgava, November 22-23, 2012 / Latvia University of Agriculture. Faculty of Veterinary Medicine. (Veterinary Articles 2012). Jelgava: LLU, 136 - 142.
5. Skuja, S., Antāne, V. (2010). *The ovary activity in cows with and without retained fetal membranes.* "Animals. Health. Food Hygiene": International Scientific Conference, Jelgava, October 29, 2010 / Latvia University of Agriculture. Faculty of Veterinary Medicine. Jelgava: LLU, 117.-124.
6. Skuja, S., Antāne, V. (2010). *Bacteriological and morphological studies of cow's uterus with and without retained fetal membranes.* 14th International conference on production diseases in farm animals (ICPD): book of proceedings, Ghent, Belgium, 20-24 June 2010 / Ghent University. Ghent. 99-100.
7. Skuja, S., Antāne, V. (2010). *Concentration of progesterone in the blood serum in cows with and without retained fetal membranes.* 8th International Ruminant reproduction symposium: program and abstracts, Anchorage, Alaska, September 3-7, 2010. Anchorage, 160.

8. Skuja, S., Antāne, V. (2008). *Comparison of bacteriological and histological parameters and reproductive performance in cows uterus with and without retained fetal membranes.* "Animals. Health. Food hygiene": international scientific conferences. Jelgava, November 14, 2008. Latvian University of Agriculture. Faculty of Veterinary Medicine. Jelgava: LLU. 164-169.
9. Skuja, S., Antāne, V., Feldmane, L. (2008). *Bacteriological and histological studies of cow's uterus without and with retained fetal membranes.* Reproduction in Domestic Animals. Vol.43 Suppl.3: 16th International congress on animal reproduction. 65. **Web of Science database.**