

Eesti Maaülikool

Lüpsilehmadel sagedamini esinevate haiguste ja tervist peegeldavate
parameetrite riskihinnangud, nende mõju loomade karjas püsimise
edukusele, prakeerimispõhjustele ja tiinestumisele. Kompleksuuring

Projekti juht: Andres Valdmann
Projekti täitjad: Tanel Kaart
Jevgeni Kurõkin
Gret-Kristel Mällo
Merle Valdmann

Tartu 2015

PROJEKTI LÕPPARUANNE⁵

1. PROJEKTI NIMETUS: Lüpsilehmadel sagedamini esinevate haiguste ja tervist peegeldavate parameetrite riskihinnangud, nende mõju loomade karjas püsimise edukusele, prakeerimispõhjustele ja tiinestumisele. Kompleksuuring.

2. PROJEKTI NIMETUS INGLISE KEELES: Risk assessment of the most frequent diseases and parameters reflecting the health status of dairy cows, their influence on cows' retention in herds, reasons for culling and successful service. A complex study.

3. PROJEKTI KESTUS

Algus: 2011

Lõpp: 2014

4. PROJEKTI LÕPPARUANDE LÜHIKOKKUVÕTE:

Käesolevas uuringus selgitati kompleksse analüüsi teel välja sagedamini esinevate haiguste, ainevahetushormoonide ja vere metaboliitide mõju ja koosmõju korduvpoeginud eesti holsteini tõugu lüpsilehmade tiinestumisele ja karjast prakeerimisele. Leiti tiinestumist vähendavate ja prakeerimisriski suurendavate faktorite riskitegurid ja töötati välja tsütouuringu, kui uue subkliiniliste emakapõletike diagnoosimismeetodi, kasutamise strateegiad emakapõletikuga lehmade efektiivselt avastamiseks. Uuring viidi läbi ühes 1100 lüpsilehmaga tootmisfarmis. Uuritavatel lehmadel registreeriti jõudlust ja sigivust iseloomustavad parameetrid (päeva piimatoodang, seemendused, tiinestumine, karjast prakeerimine), poegimisaegsed ja -järgsed terviseprobleemid ja haigused (abistamist vajav poegimine, kaksikud, päramiste peetus, metriit, hüpokaltseemia, mädane tupenõre, mastiit, tugev longe). Määrati vere metaboliitide, esterifitseerimata rasvhapete, β -hüdrosübutüraadi, triglütseriidide, haptoglobiini, seerumialbumiini A, albumiini, kolesterooli, urea, aspartaat aminotransferaasi, gamma-glutamüültransferaasi, laktaadi dehüdrogenaasi, aluselise fosfataasi ja ainevahetushormoonide - insuliinilaadse kasvufaktori 1 (IGF1) ning insuliini kontsentratsioonid 14. poegimiseelset päeval ning 7. ja 21. poegimisjärgsel päeval. Uuringu tulemusena tehti kindlaks, et hormoon IGF1 kontsentratsioon 7. poegimisjärgsel päeval ja emaka endomeetriumi neutrofiilide osatähtsus 40. poegimisjärgsel päeval osutusid korduvpoeginud piimalehmade sigivuse ja karjas püsimise edukuse headeks prognostilisteks markeriteks. Vereplasmas kõrge IGF1 sisaldusega ja tsütoloogilise endometriidiga lehmade sigivusparameetrid olid suurepärased ja prakeerimisrisk madal. Tiinestumine esimesest seemendamisest oli selles loomade rühmas 73%, ajavahemik poegimisest tiinestumiseni 96 päeva ja prakeerimine 0%. Vastukaaluks olid kõige halvemad näitajad lehmadel, kelle vereplasma IGF1 sisaldus oli 7. poegimisjärgsel päeval madal ja kellel diagnoositi 40. poegimisjärgsel päeval tsütoloogiline endometriit. Selles loomade rühmas oli tiinestumine esimesest seemendamisest 24%, ajavahemik poegimisest tiinestumiseni 156 päeva ja karjast prakeerimine 34%. Lehmade sigivust ja karjast hoidmist mõjutas kõige enam tsütoloogiliselt diagnoositud endometriit. Tsütoloogilise endometriidi diagnoosita lehmade sigivust mõjutas kõige enam vereplasmas IGF1 sisaldus 7. poegimisjärgsel päeval. Tuvastati, et tsütoloogilisse endometriiti haigestumise riskiteguriteks on madal poegimiseelne energiatase, poegimisjärgne tugev põletikureaktsioon, kliinilised haigused ning niihästi kõrge kui ka madal piimatoodang. Tsütoloogilisse endometriiti haigestus kaks täiesti erinevat tüüpi loomade rühma: 1. poegimishäiretega ja/või kliiniliselt haiged ning madala piimatoodanguga loomad ja 2. kliiniliselt terved kõrge piimatoodanguga loomad. Tsütoloogilise endometriidi suuremat esinemissagedust kõrge piimatoodanguga kliiniliselt tervetel lehmadel selgitab nende sügavama negatiivse energiabilansiga kaasnev metaboolne stress, mis pidurdab emakat kaitsva immuunvastuse teket. Tsütoloogilisse

endometriiti haigestumise riski vähendamiseks on vajalik tagada kinnislehmade optimaalne poegimiseelne kehakonditsioon, mis käesoleva uuringu tulemustele toetudes võiks olla vahemikus 3,5-3,75. Väga oluline on vältida poegimiseelset madalat kehakonditsiooni (<3,0), sest poegimiseelse madala kehakonditsiooniga lehmadel kasvas oluliselt tsütoloogilisse endometriiti haigestumise risk. Lähtudes uuringu tulemustest, et tsütoloogiline endometriit ja vereplasma IGF1 madal kontsentratsioon avaldavad olulist negatiivset mõju lehmade sigivusele ja karjas püsimisele, on sigimisprobleemidega karjades õigustatud IGF1 ja endometriidi tsütoloogiline seire. Lisaks on endomeetriumi tsütouuringuga võimalik hinnata metriidi ravi tulemuslikkust. Kuna tsütoloogiline endomeetriit vähendab väga oluliselt lehmade tiinestumist ja karjas hoidmist, siis oleks otstarbekas välja töötada abiõude programm tsütoloogilise endometriidi vähendamiseks sigimisprobleemidega piimakarjades.

5. LÜHIKOKKUVÕTE INGLISE KEELES:

The main objective of the study was to develop new diagnostic procedures and tools for early detection of cows with high risk of disease, subfertility and culling. In the project the effects of clinical and subclinical diseases, metabolic and endocrine variables in multiparous Estonian Holstein dairy cows on infertility risk and culling risk were investigated. Associations between biomarkers such as metabolic hormones and blood energy metabolites with the risk of disease incidence, reproductive failure and culling were established. Their usefulness in prediction of disease risk such as cytological endometritis, risk of overall subfertility, reproductive failure and culling were investigated. Strategies for the use of the method of uterine cytology for the diagnosis of uterine inflammation in dairy cows were elaborated in field trial. To improve reproductive efficiency in multiparous cows it is suggested to elaborate a program for deminishing the incidence rate of cytological endometritis in multiparous dairy cows.

6. TEEMA RAAMES ILMUNUD PUBLIKATSIOONID:

2014

1. Waldmann A., Valdmann M., Kurykin J., Mällo G.-K., Kaart T. and Larsen T. (2014). Cytological evaluation of uterine health status in the cow. UTERINE HEALTH. Proceedings from a European seminar in Uppsala, Sweden, November 7, 2013. Renée Båge, Bodil Ström Holst & Patrice Humblot (editors), CRU Report 29, Uppsala 2013, ISSN 1404-5915; ISBN 978-91-576-9193-4, Tryck: SLU Service/Repro, Uppsala 2014.
2. Waldmann A.; Valdmann M., Kurykin J., Kaart T., Mällo G.-K. (2014). Blood plasma insulin-like growth factor 1 (IGF-1) concentrations in combination with the cytological endometritis status as predictors for reproductive performance and likelihood of culling in multiparous dairy cows. p 579 in Reproduction in Domestic Ruminants VIII. Proceedings of the Ninth International Symposium on Reproduction in Domestic Ruminants, Obihiro, Hokkaido, Japan, August 2014, Edited by: JL Juengel, A Miyamoto, C Price, LP Reynolds, MF Smith, R Webb. Context Products Ltd 2014.
3. Valdmann A.; Valdmann M., Kurykin J., Kaart T., Mällo G.-K. (2015). Piimalehmade sigivuse ja karjas püsimise edukuse prognostilised markerid. Konverentsi "Terve loom ja tervislik toit 2015" kogumik, 26-31, Tartu: Eesti Maaülikool.

2013

1. Waldmann A., Valdmann M., Kurykin J., Mällo G.-K., Kaart T. and Larsen T. (2013). Blood plasma variables as indicators of cytological endometritis risk in multiparous Holstein dairy cows. 15th International Conference on Production Diseases on Farm Animals, Uppsala, Sweden 24-28 June 2013. Book of Abstracts P 30.
2. Valdmann A. Lüksilehmade sigivuse parandamine. Piimafoorum 2013, lk 38-41. Eesti Põllumajandus-Kaubanduskoda. <http://www.epkk.ee/orb.aw/class=file/action=preview/id=6854/Piimafoorum+2013.pdf>.
3. Kurõkin, Jevgeni; Valdmann, Andres; Aljas, Andres; Jaakma, Ülle (2013). Superovulatsiooni prognoosimine embrüodoonorlehmadel piima progesteroonisisalduse järgi. Konverentsi "Terve loom ja tervislik toit 2013" kogumik (16 - 24). Tartu: Eesti Maaülikool.

2012

1. Waldmann, A; Valdmann, M; Kaart, T; Kurykin, J; Mällo, GK; Larsen, T. (2012) Low insulin-like growth factor-1 concentrations before parturition are associated with the development of cytological endometritis in multiparous dairy cows, Reproduction in Domestic Animals, 47(s4), 478-478.
2. Valdmann, M.; Valdmann, A. (2012). Lehmade emakapõletiku diagnoosimisviisi võimaldab prognoosida tiinestumist. Konverentsi "Terve loom ja tervislik toit 2012" kogumik, 113-122, Tartu: Eesti Maaülikool.

3. Mällo, G.-K.; Valdmann, A. (2012). Soovitusi inna avastamiseks ALPRO tehnoloogia abil. Konverentsi "Terve loom ja tervislik toit 2012" kogumik, 86-93, Tartu: Eesti Maaülikool.
4. Jeremejeva J, Orro T, Waldmann A, Kask K. (2012). Treatment of dairy cows with PGF2alpha or NSAID, in combination with antibiotics, in cases of postpartum uterine inflammation. *Acta Vet Scand.* 54(1):45.

2011

1. Valdmann, M.; Valdmann, A.; Kurõkin, J., Mällo, G.-K. (2011). Poegimisjärgse endometriidi tsütoloogiline diagnoosimine lüpsilehmadel. *Eesti Loomaarstlik Ringvaade*, 2, 2-6.
2. Valdmann, A. Inna avastamine ja lehmade õigeaegne seemendamine on piimakarja sigivuse võtmetegur. *JKK infoleht märts 2011*. <http://www.jkkeskus.ee/page.php?page=0045>.
3. Valdmann A., Valdmann M. Seade tsütoloogiliste, bakterioloogiliste ja emakanõre proovide võtmiseks. *EE 05470 B1. EE PATENDILEHT 5/2011*, lk. 12, 17.10.2011.
4. Valdmann, M.; Kurykin, J.; Mällo, G.-K.; Waldmann, A. (2011). Associations of cytological endometritis with ovarian function in dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(s3), 157 - 157.
5. Mällo, G.-K.; Kaart, T.; Sveberg, G.; Reksen, O.; Ropstad, E.; Waldmann, A. (2011). Effect of time of resumption of ovarian cyclicity on the efficiency of oestrus detection in dairy cows by ALPRO. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(s3), 126 - 126.
6. Kurykin, J.; Waldmann, A.; Tiirats, T.; Kaart, T.; Jaakma, Ü. (2011). Morphological Quality of Oocytes and Blood Plasma Metabolites in Repeat Breeding and Early Lactation Dairy Cows. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(2), 253 - 260.

Rahvusvahelise koosöö tulemusena ilmunud publikatsioonid

1. Sveberg, G.; Rogers, G.W.; Cooper, J.; Refsdal, A.O.; Erhard, H.W.; Kommisrud, E.; Buckley, F.; Waldmann, A.; Ropstad, E. (2014). Comparison of Holstein-Friesian and Norwegian Red dairy cattle for estrus length and estrous signs. *Journal of Dairy Science*, doi: 10.3168/jds.2014-8905.
2. Sveberg G., Refsdal A.O., Erhard H.W., Kommisrud E., Aldrin M., Tvette I.F., Buckley F., Waldmann A., Ropstad E. (2013). Sexually active groups in cattle—a novel estrus sign. *J Dairy Sci.* 2013 Jul;96(7):4375-86.
3. Elkjær, K.; Ancker, M. L.; Gustafsson, H.; Friggens, N. C.; Waldmann, A.; Mølbak, L.; Callesen, H. (2013). Uterine bacterial flora in postpartum Danish Holstein dairy cows determined using DNA-based fingerprinting: Correlation to uterine condition and calving management. *Animal Reproduction Science*, Volume 138, Issues 1–2, April 2013, Pages 39–48.
4. Sveberg, G.; Refsdal, A.O.; Erhard, H.W.; Kommisrud, E.; Aldrin, M.; Tvette, I.F.; Buckley, F.; Waldmann, A.; Ropstad, E. (2011). Behavior of Lactating Holstein Friesian Cows during Spontaneous Cycles of Estrus. *J Dairy Sci.* 94, 1289–1301.

Teema raames saadud tulemuste ettekanded rahvusvahelistel konverentsidel, sümposiumitel, seminaridel

1. Andres Valdmann „Blood plasma insulin-like growth factor 1 (IGF-1) concentrations in combination with the cytological endometritis status as predictors for reproductive performance and likelihood of culling in multiparous dairy cows“. Stendiettekanne rahvusvahelisel sümposiumil 9th International Ruminant reproduction Symposium August 25-29, 2014, Obihiro, Hokkaido, Japan.
2. Andres Valdmann „Blood plasma variables as indicators of cytological endometritis risk in multiparous Holstein dairy cows“. Suuline ettekanne konverentsil 15th International Conference on Production Diseases on Farm Animals, Uppsala, Rootsi 24.-28. juuni 2013.
3. Andres Valdmann. „Cytological evaluation of uterine health status in the cow“. Suuline ettekanne rahvusvahelisel seminaril UTERINE HEALTH. European seminar in Uppsala, Rootsi Põllumajandusülikool, 7. november 2013.
4. Andres Valdmann „Low insulin-like growth factor-1 concentrations before parturition are associated with the development of cytological endometritis in multiparous dairy cows“ Suuline stendiettekanne rahvusvahelisel kongressil 17th International Congress on Animal Reproduction (ICAR), Vancouver, Kanada, 29. juuli- 2. august 2012.

Teema raames saadud tulemuste esitamine tootjatele

1. Andres Valdmann. 'Lüpsilehmade emakapõletikud - mõju sigivusele ja karjast prakeerimisele'. Ettekanne Jõudluskontrolli Keskuse infopäeval, 7. Aprill 2011, Tartu.

2. Andres Valdmann. Kuidas üle trumbata pulli...? Inna avastamine. Ettekanne OÜ Greenfeed ja EMÜ poolt korraldatud konverentsil „Mäletsejaliste otstarbekas ratsioonivalik - karja taastootmise alus“, Tartu, EMU, 22.03.2012.
3. Andres Valdmann. Inna tunnused ja inna avastamine. Ettekanne kursusel „Veiste seemenduskursus“, Tartu, EMÜ Avatud Ülikool, 09. 01.2012.
4. Andres Valdmann, Merle Valdmann. Lehmade sigivus. Lehmade emakapõletiku diagnoosimisviisi võimaldab prognoosida tiinestumist. Ettekanne konverentsil „Terve loom ja tervislik toit“. Tartu, EMÜ, 29.-30. märts 2012.
5. Andres Valdmann. Sagedamini esinevate haiguste mõju lüpsilehmade sigivusele ja karjas püsimisele. Ettekanne JKK koolitusel "Andmete registreerimine - ajasääst või ajakulu", Rakvere, 01. - 02.03.2012.
6. Andres Valdmann. "Miks osa lehma ei tiinestu siis, kui meil vaja on?" Ettekanne seemendustehnikute atesteerimise koolitusel, ETKÜ, Rakvere, 15.03.2012.
7. Andres Valdmann. "Miks osa lehma ei tiinestu siis, kui meil vaja on?" Ettekanne seemendustehnikute atesteerimise koolitusel, ETKÜ, Tartu, 27.03.2012.
8. Andres Valdmann. Lüpsilehmade sigivust mõjutavad tegurid. Ettekanne PRIA infopäeval „Uued sigimisseire meetodid ja tehnoloogiad“, EMÜ, Tartu, 27.03.2012.
9. Gret-Kristel Mällo. Inna avastamine aktiivsuse abil. Ettekanne PRIA infopäeval „Uued sigimisseire meetodid ja tehnoloogiad“, EMÜ, Tartu, 24.05.2012.
10. Gret-Kristel Mällo. Inna avastamine Alpro tehnoloogia abil. Ettekanne konverentsil „Terve loom ja tervislik toit“. Tartu, EMÜ, 29.-30. Märts 2012.
11. Merle Valdmann. Uus meetod lehmade subkliiniliste emakapõletike avastamiseks. Ettekanne PRIA infopäeval „Uued sigimisseire meetodid ja tehnoloogiad“, EMÜ, Tartu, 24.05.2012.
12. Andres Valdmann. „Inna avastamine lehmadel“ ettekanne Veiste seemenduskursusel, Eesti Maaülikool, 9. Jaanuar 2013.
13. Andres Valdmann. Rakendusuringu projekti „Lüpsilehmadel sagedamini esinevate haiguste ja tervist peegeldavate parameetrite riskihinnangud, nende mõju loomade karjas püsimise edukusele, prakeerimis põhjustele ja tiinestumisele. Kompleksuuring“ tulemuste tutvustamine tootjatele. Teemad: „Uued sigimisseire meetodid ja tehnoloogiad“ ja „Lehmade sigimist ja karjast prakeerimist mõjutavad tegurid“ . Ettekandepäev OÜ Estonias, 08.05.2013.
14. Andres Valdmann. „Biomarkers related to the dairy cow endometritis, ovarian function and fertility“ , ettekanne rahvusvahelisel doktorantide kursusel „Biomarkers in Dairy Science“, Eesti Maaülikool, 24.-27. september 2013.
15. Andres Valdmann „Piimalehmade sigivuse ja karjas püsimise edukuse prognostilised markerid“ Ettekanne konverentsil “Terve loom ja tervislik toit 2015” 5. märts 2015, Tartu, Eesti Maaülikool.
16. Andres Valdmann, Merle Valdmann. Rakendusuringu projekti „Lüpsilehmadel sagedamini esinevate haiguste ja tervist peegeldavate parameetrite riskihinnangud, nende mõju loomade karjas püsimise edukusele, prakeerimis põhjustele ja tiinestumisele. Kompleksuuring“ tulemuste tutvustamine tootjatele. Ettekanded PRIA infopäevadel 24. aprillil Tartus ja 28. aprillil Haapsalus, 2015.

Projekti juht (ees- ja perekonnanimi): Andres Valdmann	Allkiri:	Kuupäev: 01.03.2015
Taotleja esindaja kinnitus aruande õigsuse kohta (ees- ja perekonnanimi): Andres Aland	Allkiri:	Kuupäev: 01.03.2015

Projekti lõpparuande täitmise juhend on kättesaadav Põllumajandusministeeriumi koduleheküljel

<http://www.agri.ee>

Lüpsilehmadel sagedamini esinevate haiguste ja tervist peegeldavate parameetrite riskihinnangud, nende mõju loomade karjas püsimise edukusele, prakeerimis põhjustele ja tiinestumisele. Kompleksuuring

Uurimistöo taust ja probleemi olulisus

Haiguste ja sigimatuse tõttu pealesunnitud karjast prakeerimine ja pikk poegimisvahemik on kõige olulisemad piima tootmise tasuvust piiravad faktorid (Inchaisri jt., 2010). Tiinestumine ja karjast prakeerimine ei sõltu mitte ainult lehmade pidamisest, vaid on otseselt seotud kõrgele toodangupotentsiaalile suunatud geneetilisele valikule kaasnevate terviseprobleemidega (Dobson jt., 2008) ning metaboolsete muutustega (Gutierrez jt., 2006, Wathes jt., 2007). Meie poolt varem läbiviidud uuringute tulemused näitavad, et mitmete haiguste, eelkõige emakapõletike, tegelikku esinemust ja mõju tiinestumisele ning karjast prakeerimisele on alahinnatud.

Lüpsilehmadel on üleminekuperioodil haigustele vastuvõtlikkuse võtmeteguriks kehareservide mobilisatsioon (Ingvarsen jt., 2000). Kui lehm on poegimisjärgselt sügavas negatiivse energiabilansi seisundis, siis on seda veterinaarsete menetluste abil laktatsiooni ajal väga keeruline korrigeerida ning taastumine võib olla väga pikaajaline. Põletikuliste muutuste poolt tekitatud kahju emakale võib olla pöördumatu, mille tagajärjel loom enam ei tiinestu ning ta prakeeritakse karjast. Tervist ja sigivust kontrollivad mitmed hormoonid ja metaboliidid, toimides vastavalt looma füsioloogilisele seisundile, säilitamaks normaalset homöostaasi (Velazquez jt., 2008). Insuliinilaadnee kasvufaktor 1 (IGF1) moduleerib mitmeid immuunsüsteemi protsesse (Vangroenweghe jt., 2005). Adekvaatse energiatarbega loomadel on kõrgem IGF1 tase, mille tõttu võib sellistel loomadel olla ka parem immuunsus ehk sellised loomad võiksid olla haigustele vähem vastuvõtlikud, samuti võiksid kõrge IGF1 tasemega loomad kiiremini tervistuda. Kuna endokriinne IGF1 peegeldab lehmadel nii metaboolset seisundit kui ka paremini toimivat immuunfunktsiooni, siis arvame, et IGF1 võiks olla loomade haigestumise ja karjast prakeerimise prognostiliseks markeriks, samuti olla markeriks tervete, hästi sigivate ja karjas püsivate loomade selektsioonil. Lisaks IGF1-le on mitmeid teisi metaboliite, mida on seostatud erinevate haigustega, näiteks haptoglobiini (HP) kontsentratsioone metriitidega (Huzzey jt., 2009); β -hüdrosübutüraadi (BHB), esterifitseerimata rasvhapete (NEFA) ja glükoosi kontsentratsioone somaatiliste rakkude arvuga (Nyman jt., 2008), mastiiti haigestumise riskiga (Moyes jt., 2009) ning emakapõletikega (Galvao jt., 2010). Hiljuti avaldati vereseerumi BHB, NEFA ja kaltsiumi piirväärtused lehmade haigestumise prognoosimisel USA-s ja Kanadas (Ospina jt., 2010; Seifi jt., 2011).

Eesmärgid

1. Kompleksse analüüsi teel välja selgitada sagedamini esinevate kliiniliste ja subkliiniliste haiguste, ainevahetushormoonide ja vere metaboliitide mõju ja koosmõju lüpsilehmade tiinestumisele ja karjast prakeerimisele ehk leida kõige olulisemad tiinestumist vähendavad ja prakeerimisrisiki suurendavad faktorid.
2. Leida tiinestumist vähendavate ja prakeerimisrisiki suurendavate faktorite riskitegureid.
3. Töötada välja tsütouuringu, kui uue subkliiniliste emakapõletike diagnoosimismeetodi, kasutamise strateegiad emakapõletikuga lehmade efektiivseks avastamiseks.
4. Toetudes saadud tulemustele anda tootjatele konkreetseid soovitusi lehmade sigimisalase olukorra parandamiseks ja prakeerimisrisiki vähendamiseks.

Läbiviidud tööd ja kasutatud uurimismeetodid

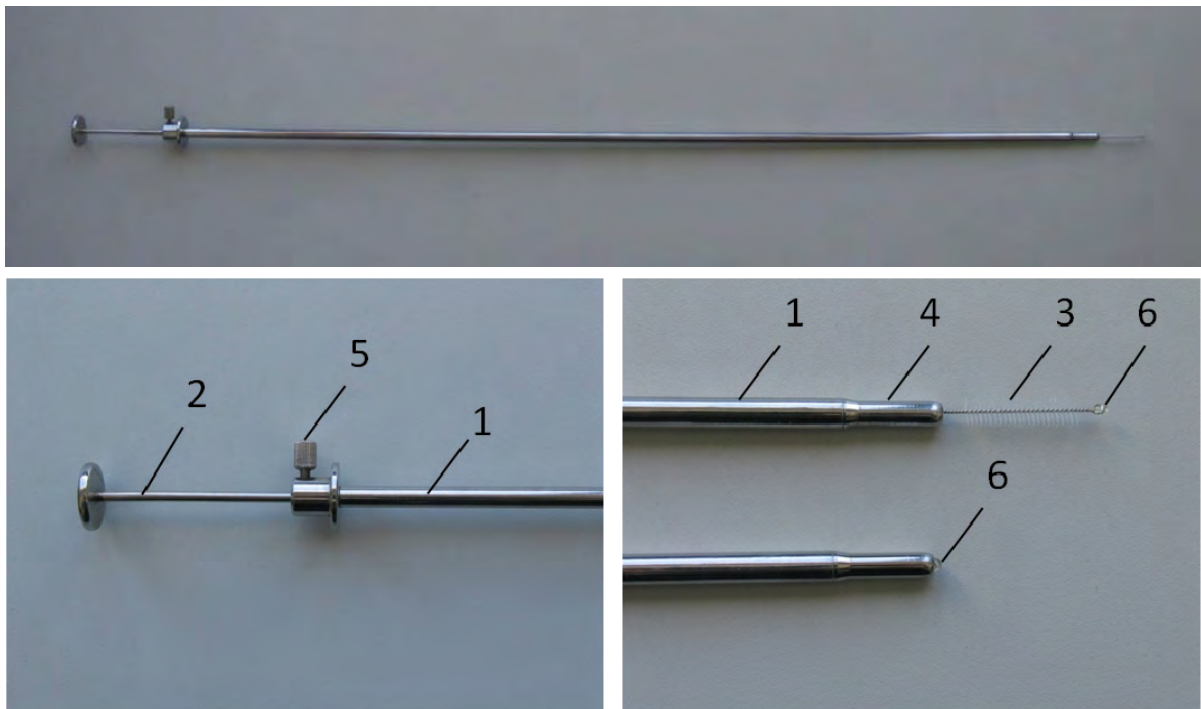
Seadsime eesmärgiks uurida korduvpoeginud lehma, sest korduvpoeginud lehmad moodustavad 2/3 lehmapiimalehmade populatsioonist ning korduvpoeginud lehmad annavad Eesti Jõudluskontrolli Keskuse andmetel aastas lehma kohta keskmiselt üle 1000 kg rohkem piima, võrreldes esmaspoeginud lehmadega. Seega, piimakarja majandamise seisukohalt on eriti oluline parandada korduvpoeginud lehmade tervist, sigivust ja karjas püsivust. Käesoleva uuringu eesmärgiks oli selgitada kõige olulisemad korduvpoeginud lehmade sigivust ja karjas hoidmist mõjutavad tegurid.

Uuring viidi läbi ühes 1100 lüpsilehmaga tootmisfarmis, kus kasutatakse ALPRO (DeLaval, Tumba, Rootsi) piimafarmi majandamise tehnoloogiat. Majandi valikul oli oluliseks kriteeriumiks koostöövalmidus, funktsioneeriva ALPRO tehnoloogia olemasolu, samuti massilist piimaproovide kogumist võimaldava lüpsitehnoloogia olemasolu. Uuringusse kaasati 126 korduvpoeginud piimalehma. Seitse lehma arvati uuringust välja, kuna nad praagiti karjast enne endomeetriumi tsütoproovi võtmist, so. enne 40. poegimisjärgset päeva. Eeltoodust tulenevalt jäi uuringusse 119 korduvpoeginud eesti holsteini tõugu piimalehma.

Uuritavatel lehmadel registreeriti jõudlust ja sigivust iseloomustavad parameetrid (päeva piimatoodang, seemendused, tiinestumine, karjast prakeerimine). Lisaks registreeriti kõikidel katselehmadel poegimisaegsed ja -järgsed terviseprobleemid ja haigused (abistamist vajav poegimine, kaksikud, päramiste peetus, metriit, hüpokaltseemia, mädane tupenõre, mastiit, tugev longe). Vere metaboliitide ja ainevahetushormoonide määramiseks koguti vereproovid 14. poegimiseelisel päeval ning 7. ja 21. poegimisjärgsel päeval. Tsentrifuugimisega eraldati

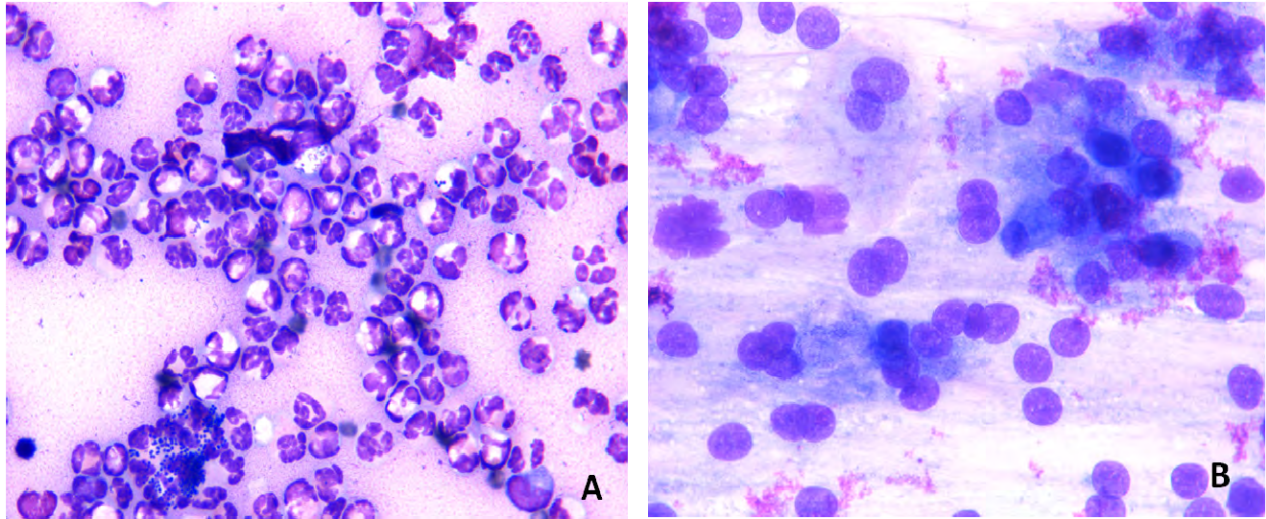
vereplasma, mida säilitati temperatuuril -80°C kuni ainevahetushormoonide ja vere metaboliitide määramiseni. Ainevahetushormoonide IGF1 ja insuliini, põletikumarkeri seerumialbumiini A (SAA) kontsentratsioonid määrati ELISA meetodiga. Kõikide ülejäänud vereplasma metaboliitide NEFA, BHB, triglütseriidid, HP, albumiin, kolesterool, urea, aspartaat aminotransferaas (AST/GOT), gamma-glutamüül-transferaas (GGT), laktaadi dehüdrogenaas (LDH), aluseline fosfataas (ALP) kontsentratsioonid määrati vastavate reaktiivide komplektidega kolorimeetriliselt. Kokku tehti 6069 analüüsi.

Neljakümnendal poegimisjärgsel päeval viidi läbi emaka tsütouuring ja suguelundite ultraheliuuring. Tsütoproovid võeti Eesti Põllumajandusministeeriumi rakendusuringu toel Eesti Maaülikoolis Andres ja Merle Valdmanni poolt väljatöötatud tsütomaterjali võtmise riistastiku abil (joonis 1).



Joonis 1. Instrument lehmade emakast proovide võtmiseks. Instrument koosneb jäigast juhttorust 1, läbi juhttoru ulatuvast vardast 2, millele on kinnitatud tsütohari 3, juhttoru 1 otsa kinnitatud juhttoru mütsist 4 ning juhttoru tagumises otsas paiknevast varrast fikseerivast kruvist 5. Tsütoharja saastumise vältimiseks on juhttoru müts 4 varustatud sissepoole suunduva koonusega, et tsütoharja kuul 6 sobituks tihedalt tsütoharja juhttoru mütsiga 4. Tsütoharja asend proovi võtmise ja proovi esemeklaasile kandmise ajal (üleval) ja saastumist vältivas hülsis (all, alumisel parempoolsel joonisel). Instrumendile omistati 2011. aastal Eesti Vabariigi patent EE 05470 B1. Eesti Maaülikool taotleb tsütomaterjali võtmise riistastikule Euroopa patenti.

Igast tsütoproovist valmistati 4 äiet, millest 2 värviti May-Grünwald-Giemsa järgi ja 2 säilitati immunotsütokeemilisteks uuringuteks. Mikroskoobi all loeti kokku emaka epiteeli rakud ja põletikule iseloomulikud rakud (konkreetselt neutrofiilid (PMN)) (joonis 2) ning arvatati viimaste protsent.



Joonis 2. Tsütopreparaat. (A) Tsütoloogiline endometriit. Polümorftuumalised rakud on domineeriv rakutüüp. Preparaadis on näha ka neutrofiilidesse sulundunud baktereid. May-Grünwald-Giemsas X1000. (B) Tsütoloogiliselt terve emakas. Domineerivad emakaepiteeli vabad rakutuomad. May-Grünwald-Giemsas X1000.

Põletiku klassifitseerimise optimaalne kriteerium leiti emakate tsütouuringute tulemusena saadud neutrofiilide osakaalu ja tiinestumise andmete suhteliste töökarakteristikute (receiver operator characteristic – ROC) kõvera analüüsil. Optimaalseks kriteeriumiks loeti väärtus, mis andis ROC-kõvera analüüsil tundlikkuse ja spetsiifilisuse maksimaalse summa.

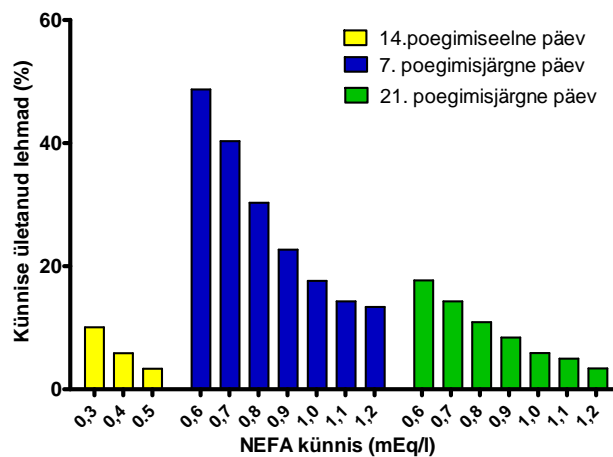
Munasarjafunktsiooni iseloomustamiseks koguti piimaproovid kaks korda nädalas alates poegimisest vähemalt kuni 65. tiinuspäevani või karjast prakeerimiseni. Piima progesteroonisisaldust määrati ensüümimmunoloogilise meetodiga (Waldmann 1999). Kokku analüüsiti progesteroonisisaldust >8000 piimaproovist. Iga lehma jaoks koostati progesterooniprofiil, mille abil tehti kindlaks poegimisjärgselt esimese ovulatsiooni aeg, toimunud ovulatsioonid/innad, reproduktsioonitsükli faas (anöstrus, follikulaarfaas, luteaalfaas, tiinus), samuti munasarjafunktsiooni häired (pikenenud anovulatoorne periood, pikenenud luteaalfaas, innatsükli katkemine) ja embrüo hukkumine. Lehmade kehakonditsiooni hinnati Ferguson jt. (1994) järgi, lonkeid Sprecher jt. (1997) järgi 1 kord nädalas.

Statistiline analüüs ja joonised tehti statistikapaketidega SAS version 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC), R version 2.15.2 (2012, The R Foundation for Statistical Computing), MedCalc Statistical Software version 14.12.0 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <http://www.medcalc.org>; 2014), GraphPad Prism 5, Version 5.02 (GraphPad Software, Inc) ja Microsoft Office Excel 2007. Kasutatud statistilise analüüsi meetodid on toodud tulemustes.

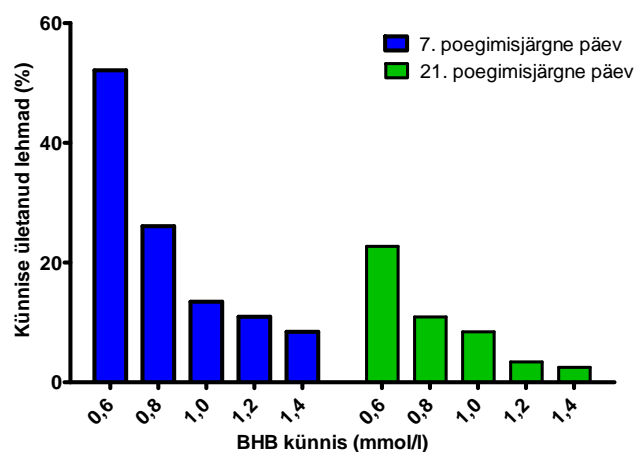
Tulemused

Katselehmade energiaseisund

Esmalt hindasime katselehmade energiaseisundit, määrares vereplasma NEFA ja BHB sisaldust enne ja pärast poegimist. NEFA ja BHB erinevaid künniseid ületavate lehmade proportsioon on toodud joonisel 3. Jooniselt 3 on näha, et enne poegimist oli 10%-l lehmadest NEFA kontsentratsioon >0,3 mEq/l, üks nädal pärast poegimist ületas 0,6 mEq/l künnise 49% lehmadest ning 3 nädalat pärast poegimist 18% lehmadest. Üks nädal pärast poegimist ületas 1,0 mmol/l BHB künnise 13% lehmadest ning 3 nädalat pärast poegimist 8% lehmadest (joonis 4).



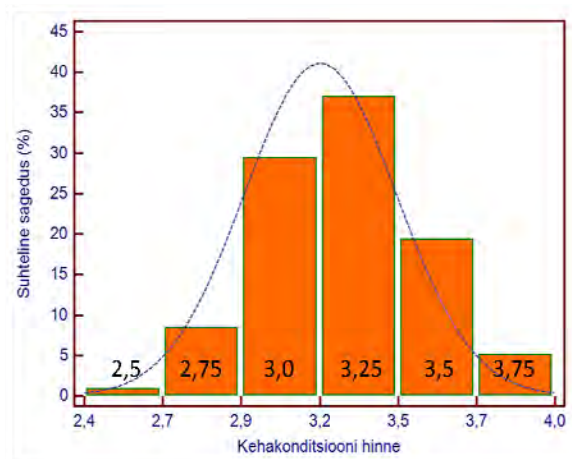
Joonis 3. Esterifitseerumata rasvhapete (NEFA) künnise ületanud lehmade proportsioon 2 nädalat enne poegimist, 1 nädal pärast poegimist ning 3 nädalat pärast poegimist



Joonis 4. β -hüdroksübutüraadi (BHB) künnise ületanud lehmade proportsioon 1 nädal pärast poegimist ja 3 nädalat pärast poegimist

Uuritud lehmade energiaseisund enne ja pärast poegimist vastab maailmas läbiviidud teiste uuringute keskmisele tasemele või on isegi parem. Näiteks Seifi jt. (2011) andmetel ületas Kanadas läbiviidud suuremahulises uuringus (849 lehma, 16 karja) esimesel poegimisjärgsel nädalal NEFA künnise $>0,6$ mEq/l 67% lehmadest (meil 49%) ning NEFA künnise $>1,0$ mEq/l 36,6% lehmadest (meil 18%). Samas uuringus ületas esimesel poegimisjärgsel nädalal BHB künnise $>0,8$ mmol/l 44,6% lehmadest (meil 26%) ja $>1,0$ mmol/l 36,6% lehmadest (meil 14%). Teises, USA-s läbiviidud suuremahulises uuringus (Ospina jt., 2010) (2700 lehma, 100 karja), ületas poegimiseelse NEFA künnise $>0,3$ mEq/l 34% lehmadest (meil 10%) poegimisjärgse NEFA künnise $>0,7$ mEq/l 32% lehmadest (meil 49%) ja poegimisjärgse BHB künnise $>1,2$ mmol/l 18% lehmadest (meil 10%).

Katselehmade poegimiseelne kehakonditsioon vastas kirjanduses soovitatule, olles 2 nädalat enne poegimist keskmiselt $3,2 \pm 0,60$ palli. Joonisel 5 toodud histogrammilt on näha, et poegimiseelselt liiga madala kehakonditsiooniga ($<2,75$ palli) lehmi oli ainult 1%. Rasvunud lehmi kehakonditsiooniga $>3,75$ ei olnud.



Joonis 5. Katselehmade kehakonditsiooni hinnete suhteline esinemussagedus.

Saadud tulemus näitab, et uuritud lehmade energiaseisund vastas maailmas holsteini tõugu lehmade kekmisele energiaseisundile, olles seega holsteini tõule representatiivne.

Energiametaboliitide seosed tiinestumisega

Mitmetes hiljuti avaldatud uuringutes (Ospina jt., 2010, Seifi jt., 2011), on vereplasma NEFA ja BHB kontsentratsioonide määramist kasutatud tiinestumise ja haiguste prognoosimiseks. Nimetatud autorid kehtestasid optimaalsed metaboliitide kontsentratsioonid ehk künnised, mida ületades

kasvab oluliselt haigestumise ja mittetiinestumise risk. Teised autorid on aga energiametaboliitide mõjust tiinestumisele saanud vasturääkivaid tulemusi. Duffield jt. (2009) leidsid, et kõrgeenenud BHB kontsentratsioonide korral >1 mmol/l esimesel poegimisjärgsel nädalal ja >1,4 mmol/l teisel poegimisjärgsel nädalal vähenes tiinestumine esimesest seemendamisest. Chapinal jt. (2012) ja Sefi jt. (2011) uuringutes aga kõrgeenenud NEFA ja BHB kontsentratsioonid tiinestumist ei mõjutanud. Käesolevas uuringus selgitasime energiametaboliitide NEFA ja BHB ning ainevahetushormooni IGF1 seosed eesti holsteini tõugu korduva poeginud lehmade tiinestumisega. Tiinestumise prognoosimiseks leiti esmalt ROC-kõvera analüüsil iga uuritava energiametaboliidi optimaalne piirväärtus. Seejärel selgitati logistilise regressioonanalüüsiga NEFA, BHB ja IGF1 mõju tiinestumisele esimesest seemendamisest ja tiinestumisele 150. poegimisjärgsel päeval. Logistiliste regressioonanalüüside tulemused on esitatud tabelites 1, 2 ja 3.

Tabel 1. Tiinestumist esimesest seemendamisest mõjutavate energiametaboliitide üheparameetrilise logistilise regressioonanalüüsi tulemused.

Mudel	Muutuja	Klass	Hinnang	Standard- viga	OR ¹	95% usaldus- vahemik	p-väärtus
Mudel 1 (AUC [#] =0,63)	NEFA - 14. poegimiseelne päev	> 124mEq/l	1,161	0,417	3,19	1,411-7,228	0,0053
		≤ 124 mEq/l	Referent				
Mudel 2 (AUC=0,64)	IGF1- 14. poegimiseelne päev	>81 ng/ml	Referent	0,399	3,12	1,427-6,823	0,0044
		≤81 ng/ml	1,138				

[#] AUC - ROC-kõvera alune pind, mis näitab mudeli prognostilist täpsust.

¹ Šansside suhe

Tabel 2. Tiinestumist esimesest seemendamisest mõjutavate energiametaboliitide logistiliste regressioonanalüüside tulemused.

Mudel	Muutuja	Klass	Hinnang	Standard- viga	OR ¹	95% usaldus- vahemik	p-väärtus
Mudel 1 (AUC [#] =0,69)	NEFA - 14. poegimiseelne päev	> 124mEq/l	0,936	0,434	2,55	1,089-5,791	0,0310
		≤ 124 mEq/l	Referent				
	IGF1- 14. poegimiseelne päev	>81 ng/ml	Referent	0,416	2,52	1,114-5,685	0,0264
		≤ 81 ng/ml	0,9229				
Mudel 1 ^B (AUC=0,71)	NEFA - 14. poegimiseelne päev	> 124mEq/l	0,939	0,462	2,56	1,035- 6,323	0,0418
		≤ 124 mEq/l	Referent				
	IGF1- 14. poegimiseelne päev	> 81 ng/ml	Referent	0,448	3,03	0,158 -0,966	0,0132
		≤ 81ng/ml	1,1098				
Mudel 2 (AUC=0,63)	IGF1 7. poegimisjärgne päev	> 33 ng/ml	Referent	0,413	3,27	1,455 - 7,337	0,0041
		≤ 33ng/ml	1,1838				
Mudel 3 (AUC=0,57)	BHB 7. poegimisjärgne päev	> 1,2mmol/l	1,3412	0,672	3,82	1,024 – 14,280	0,0461
		≤ 1,2mmol/l	Referent				
Mudel 2 ^B (AUC=0,70)	IGF1 7. poegimisjärgne päev	> 33 ng/ml	Referent	0,430	3,67	1,519 – 8,842	0,0038
		≤ 33ng/ml	1,2989				
Mudel 3 ^B (AUC=0,63)	BHB 7. poegimisjärgne päev	> 1,2mmol/l	1,3255	0,684	3,76	0,985 - 14,377	0,0526
		≤ 1,2mmol/l	Referent				

[#] AUC - ROC-kõvera alune pind, mis näitab mudeli prognostilist täpsust

¹ Šansside suhe

^B Täpsustatud analüüs - mudelisse lisati laktatsioon ja aastaage

Kaks nädalat enne poegimist määratud metaboliitidest mõjutasid tiinestumist esimesest seemendamisest NEFA ja IGF1. Tabelist 1 on näha, et kui NEFA kontsentratsioon oli >124 mEq/l

ja IGF1 kontsentratsioon oli ≤ 81 ng/ml, vähenes tiinestumine esimesest seemendamisest oluliselt, šansside suhted vastavalt 3,19 ja 3,12. Kui analüüsiks kasutati mitmeparameetrilist logistilist regressioonanalüüsi, jäid nii NEFA kui ka IGF1 mudelisse kui statistiliselt olulised faktorid (tabel 2, mudel 1). Pärast uuritavate tunnuste korrigeerimist lehma vanusele ja aastaajale mudeli parameetrid oluliselt ei muutunud (tabel 2, mudel 1^B). Üks nädal pärast poegimist määratud vere metaboliitidest mõjutasid tiinestumist esimesest seemendamisest IGF1 ja BHB. Tabelist 2 on näha, et kui IGF1 kontsentratsioon oli ≤ 33 ng/ml ja BHB kontsentratsioon oli $>1,2$ mmol/l, vähenes tiinestumine esimesest seemendamisest oluliselt, šansside suhed vastavalt 3,27 ja 3,82 (mudelid 2 ja 3). Kui analüüsiks kasutati mitmeparameetrilist logistilist regressioonanalüüsi, jäi mudelisse olulise faktorina ainult IGF1, sestap analüüsiti edaspidi IGF1 ja BHB mõju tiinestumisele eraldi. Pärast uuritavate tunnuste korrigeerimist lehma vanusele ja aastaajale mudeli parameetrid oluliselt ei muutunud (tabel 2, mudel 2^B, ja mudel 3^B).

Lehmade tiinestumist 150. poegimisjärgsel päeval mõjutasid 7. poegimisjärgsel päeval määratud IGF1 ja BHB. Kui analüüsiks kasutati mitmeparameetrilist logistilist regressioonanalüüsi, jäi mudelisse olulise faktorina ainult IGF1, mistõttu analüüsiti edaspidi IGF1 ja BHB mõju tiinestumisele eraldi. Kui IGF1 kontsentratsioon oli ≤ 33 ng/ml ja BHB kontsentratsioon oli $>1,2$ mmol/l, vähenes tiinestumine 150. poegimisjärgsel päeval oluliselt, šansside suhted vastavalt 6,80 ja 3,67 (tabel 3, mudelid 1 ja 2). Pärast uuritavate tunnuste korrigeerimist lehma vanusele ja aastaajale vähenes IGF1 mudeli hinnang 7% võrra, BHB mudeli hinnang aga kasvas 13,5% võrra. (tabel 3, mudel 1 vs. mudel 1^B, ja mudel 2 vs. mudel 2^B).

Tabel 3. Lehmade 150. poegimisjärgse päeva tiinestumist mõjutavate energiametaboliitide logistiliste regressioonanalüüside tulemused.

Mudel	Muutuja	Klass	Hinnang	Standard- viga	OR ¹	95% usaldus- vahemik	p-väärtus
Mudel 1 (AUC [#] =0,67)	IGF1 7. poegimisjärgne päev	> 33 ng/ml	Referent				
		≤ 33 ng/ml	1,9169	0,529	6,80	2,413 – 19,163	0,0003
Mudel 2 (AUC=0,58)	BHB 7. poegimisjärgne päev	$> 1,2$ mmol/l	1,2993	0,5493	3,67	1,250 – 10,760	0,0180
		$\leq 1,2$ mmol/l	Referent				
Mudel 3 ^B (AUC=0,73)	IGF1 7. poegimisjärgne päev	> 33 ng/ml	Referent				
		≤ 33 ng/ml	1,7838	0,549	5,95	2,031 – 17,443	0,0011
Mudel 4 ^B (AUC=0,69)	BHB 7. poegimisjärgne päev	$> 1,2$ mmol/l	1,5020	0,583	4,49	1,433 – 14,074	0,0100
		$\leq 1,2$ mmol/l	Referent				

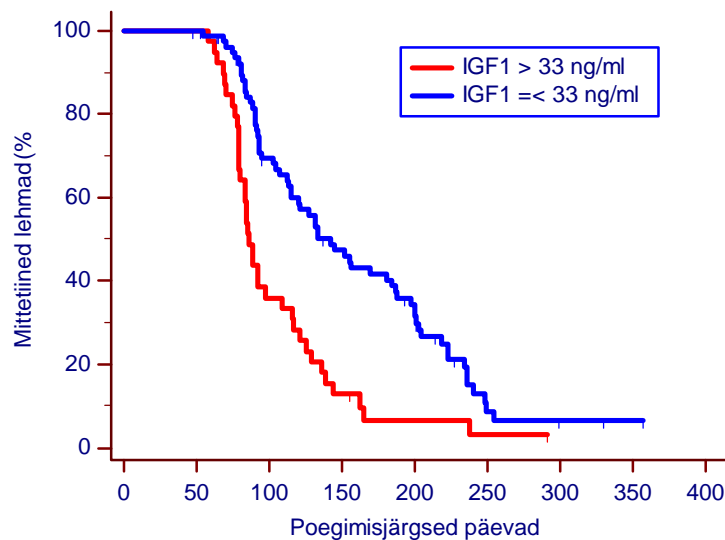
[#] AUC - ROC-kõvera alune pind, mis näitab mudeli prognostilist täpsust

¹ Šansside suhe

^B Täpsustatud analüüs - mudelisse lisati laktatsioon ja aastaaeg

Mudelite omavahelisel võrdlusel selgus, et IGF1 osutus tiinestumise prognoosimisel täpsemaks, võrreldes BHB-ga. Tiinestumise prognoosimisel esimesest seemendamisest olid mudelite kõveraalused pinnad vastavalt 0,70 ja 0,63 ning tiinestumise prognoosimiseks 150. poegimisjärgsel päeval 0,73 ja 0,69. Lisaks tiinestumise prognoosimisele võimaldas IGF1 sisaldus prognoosida ka

karjast prakeerimist. Lehmadel IGF1 kontsentratsiooniga 7. poegimisjärgsel päeval ≤ 33 ng/ml oli prakeerimise risk 1,4 korda kõrgem, võrreldes lehmadega, kelle vereplasma IGF1 sisaldus oli 7. poegimisjärgsel päeval >33 ng/ml ($P < 0,05$). Lehmadel IGF1 kontsentratsiooniga 21. poegimisjärgsel päeval ≤ 33 ng/ml oli prakeerimise risk 2,1 korda kõrgem, võrreldes lehmadega, kelle vereplasma IGF1 sisaldus oli 21. poegimisjärgsel päeval >33 ng/ml ($P = 0,01$). Joonisel 6 on toodud IGF1 mõju ajavahemikule poegimisest tiinestumiseni sõltuvalt vereplasma IGF1 kontsentratsioonist 7. poegimisjärgsel päeval. Jooniselt 6 on näha, et mediaan ajavahemik poegimisest tiinestumiseni oli madala IGF1 kontsentratsiooniga (≤ 33 ng/ml) lehmadel 56 päeva võrra pikem, võrreldes kõrge IGF1 kontsentratsiooniga (>33 ng/ml) lehmadega.



Joonis 6. Kaplani-Meieri hinnang mittetiinestunud lehmade proportsioonile sõltuvalt vereplasma IGF1 kontsentratsioonist 7. poegimisjärgsel päeval. Mediaan ajavahemik poegimisest tiinestumiseni oli kõrge IGF1 sisaldusega lehmadel 86 päeva ja madala IGF1 sisaldusega lehmadel 142 päeva. (Log-rank statistik: 16,13; $p = 0,0001$, $HR = 2,21$; $CI\ 95\% = 1,364 - 3,568$).

Järeldus

Uuritud vereplasma energiametaboliitidest ja ainevahetushormoonidest andis kõige täpsema tiinestumise prognoosi IGF1 kontsentratsiooni määramine 7. poegimisjärgsel päeval. Lisaks võimele prognoosida tiinestumist, võimaldas IGF1 kontsentratsiooni määramine prognoosida ka karjas püsimise/prakeerimise tõenäosust.

Tsütoloogilise endometriidi ja kliiniliste haiguste mõju tiinestumisele

Tsütoloogilise endometriidi klassifitseerimiskriteeriumid ja tsütoloogilise endometriidi esinemus

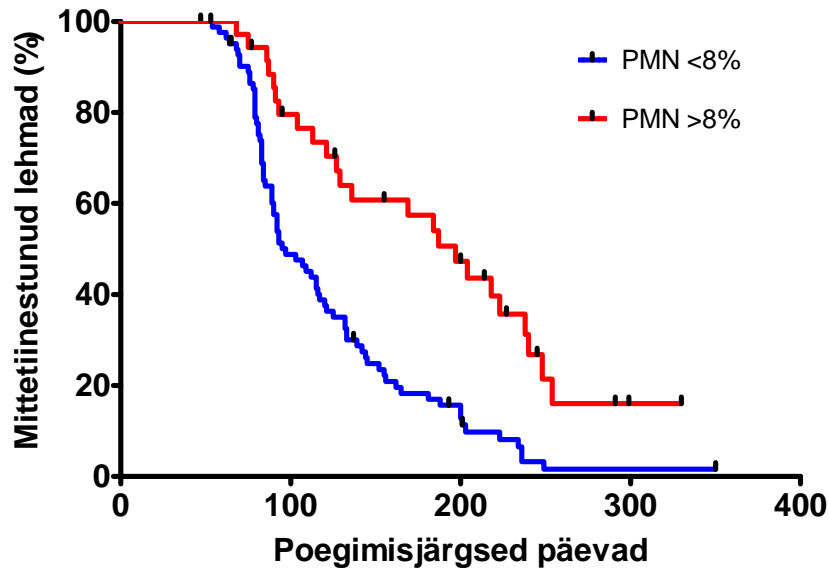
Lehmade emakate tsütouuringute tulemusena saadud neutrofiilide osakaalu, tiinestumise andmetega esimesest seemendamisest ning 85. ja 120. poegimisjärgse päeva tiinestumisandmete ROC-kõvera analüüsil leiti põletiku klassifitseerimise optimaalne kriteerium. Optimaalseks kriteeriumiks loeti väärtus, mis andis ROC-kõvera analüüsil tundlikkuse ja spetsiifilisuse maksimaalse summa.

Tabel 4. Lehmade emakate tsütouuringute tulemusena saadud neutrofiilide osakaalu, poegimisjärgselt esimese seemendamise tiinestumisandmete, poegimisjärgselt 85. ja 120. päeva tiinestumisandmete ROC-kõvera analüüsi tulemused.

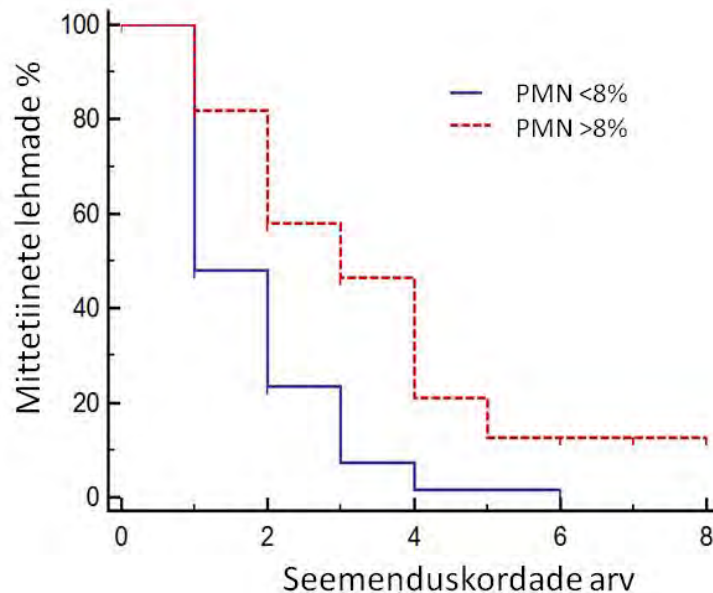
Sigivus-parameeter	ROC kõvera-alune pind	95% usaldusvahemik	p-väärtus	Klassifitseerimise optimaalne kriteerium (PMN %)	Tundlikkus (%)	95% usaldusvahemik	Spetsiifilisus (%)	95% usaldusvahemik
Tiinestumine 1. seemendamisest	0,67	0,57-0,76	<0,001	> 8	40,00	28,0-52,9	87,23	74,3-95,2
Tiinestumine 85. poegimisjärgsel päeval	0,66	0,56-0,74	0,004	>8	36,25	25,8-47,8	90,62	75,0-98,0
Tiinestumine 120. poegimisjärgsel päeval	0,64	0,54-0,73	0,009	>8	42,31	28,7-56,8	83,33	71,5-91,7

Tabelist 4 on näha, et klassifitseerimise optimaalseks kriteeriumiks oli kõikide mõõdetud sigivusparameetrite (tiinestumine 1. seemendamisest, tiinestumine 85. poegimisjärgsel päeval ja tiinestumine 120. poegimisjärgsel päeval) korral rohkem kui 8% neutrofiile ning leitud kriteerium oli statistiliselt oluliselt seotud lehmade tiinestumisega. Eeltoodust tulenevalt klassifitseeriti lehmad, kelle endomeetriumis leiti 40. poegimisjärgsel päeval üle 8% neutrofiile, endometriiti põdevateks. Tsütoloogilise endometriidi esinemus oli 30,3% (36/119).

Kuna tsütoloogilise endometriidi diagnostika põhineb tiinestumisandmetel, siis selgitasime esmalt elulemusanalüüsiga tsütoloogiline endometriidi mõju lehmade tiinestumisele. Kaplani-Meieri elulemusanalüüsi tulemustest selgus, et tsütoloogilise endometriidi diagnoosiga lehmadel pikenes mediaan ajavahemik poegimisest tiinestumiseni 100 päeva võrra, võrreldes lehmadega kellel tsütoloogilist endometriiti ei diagnoositud (joonis 7). Lisaks tiinestumise vähenemisele kasvas tsütoloogilise endometriidi diagnoosiga lehmadel tiinestumiseks kulunud seemenduskordade arv (joonis 8).



Joonis 7. Kaplani-Meieri hinnang mittetiinestunud lehmade proportsioonile sõltuvalt poegimisjärgsetest päevadest tsütoloogiliselt tervetel (PMN <8%) lehmadel ja tsütoloogilise endometriidiga (PMN >8%) lehmadel. Mediaan ajavahemik poegimisest tiinestumiseni oli tsütoloogiliselt tervetel lehmadel 97 päeva ja tsütoloogilise endometriidiga lehmadel 197 päeva. (Log-rank statistik: 17,71; $p < 0,0001$). Mustad märgid kõveratel tähistavad karjast prakeeritud lehma.



Joonis 8. Kaplani-Meieri hinnang mittetiinestunud lehmade proportsioonile sõltuvalt seemenduskordade arvust tsütoloogiliselt tervetel (PMN <8%) lehmadel ja tsütoloogilise endometriidiga (PMN >8%) lehmadel. Viiekümne % lehmade tiinestumiseks kulunud seemenduskordade arv oli tsütoloogilise endometriidiga lehmadel 3 ja tsütoloogilise endometriidita lehmadel 1 (Log-rank statistik: 19,01; $p < 0,0001$).

Haiguste esinemus

Erinevaid haigusi ja poegimisega seotud probleeme diagnoositi esimese 45 poegimisjärgse päeva jooksul 55% lehmadest. Nelikümmend viis protsenti lehmadest olid terved. Kõige sagedamini esinevateks haigusteks olid emakapõletikud. Pooltel uuritud lehmadest diagnoositi kas metriit, tsütoloogiline endometriit või samal lehmal esinesid mõlemad emakapõletiku vormid. Teiste haiguste esinemus oli madalam. Mastiite, päramiste peetust, tugevat longet ja kliinilist hüpokaltseemiat diagnoositi vastavalt 7,6; 6,7; 5,9 ja 2,5% lehmadest. Kahekümne kahel protsendil lehmadest kaasnes emakapõletikega ka mõni muu kliiniline haigus (päramiste peetus, hüpokaltseemia, mastiit, tugev longe). Lehmad, kellel emakapõletikke ei diagnoositud, olid üldjuhul terved. Ainult 7,6% lehmadest, kellel emakapõletikke ei diagnoositud esines mõni kliiniline haigus.

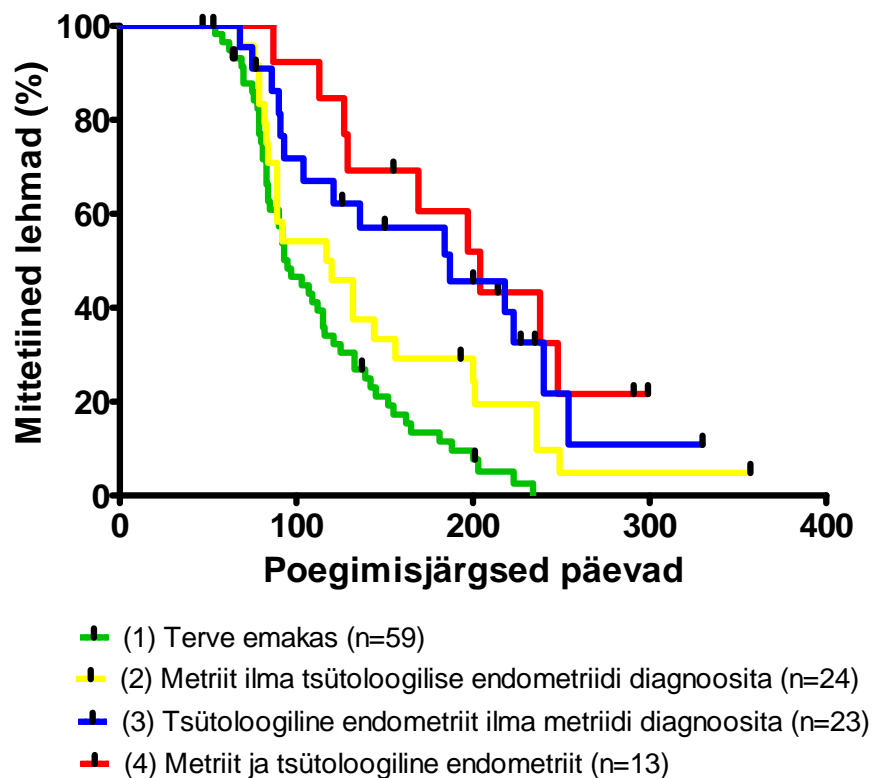
Emakapõletike mõju tiinestumisele

Kuna kõige sagedamini esinevaks haiguseks olid emakapõletikud (50% lehmadest diagnoositi kas metriit, tsütoloogiline endometriit või samal lehmal esinesid mõlemad emakapõletiku vormid), siis selgitasime emakapõletike mõju lehmade sigivusele, piimatoodangule ja karjas hoidmisele.

Uuritud lehmad klassifitseeriti 4 rühma: 1) terved lehmad - lehmad, kellel emakapõletikke ei esinenud; 2) ainult metriidiga lehmad – lehmad, kellel diagnoositi 3 esimese poegimisjärgse nädala jooksul metriit ning kellel 40. poegimisjärgsel päeval emaka tsütouuringuga emakas põletiku tunnuseid ei leitud; 3) metriidi ja tsütoloogilise endometriidiga lehmad – lehmad, kellel diagnoositi esimese 3 poegimisjärgse nädala jooksul metriit ja kellel diagnoositi 40. poegimisjärgsel päeval emaka tsütouuringuga põletik e. tsütoloogiline endometriit; 4) ainult tsütoloogilise endometriidiga lehmad – lehmad, kelle emakas oli esimese 3 poegimisjärgse nädala jooksul terve, kuid kellel diagnoositi 40. poegimisjärgsel päeval tsütoloogiline endometriit.

Emakapõletike mõju tiinestumisele on toodud joonisel 9. Jooniselt 9 on näha, et kõige vähem kulus tiinestumiseks aega lehmadel, kelle emakas oli terve. Mediaan ajavahemik poegimisest tiinestumiseni oli selles loomade rühmas 95 päeva, mis tähendab, et 95. poegimisjärgseks päevaks tiinestus 50% lehmadest. Metriidi mõju tiinestumisele sõltus ravi tulemuslikkusest. Kui metriidile ei järgnenud tsütoloogilist endometriiti, siis tervete lehmadega võrreldes pikenes mediaan ajavahemik poegimisest tiinestumiseni 23,5 päeva võrra. Lehmadel, kellel metriidi ravi aga ei olnud tulemusrikas (lisaks metriidile diagnoositi 40. poegimisjärgsel päeval tsütoloogiline endometriit), pikenes tervete lehmadega võrreldes mediaan ajavahemik poegimisest tiinestumiseni 109 päeva

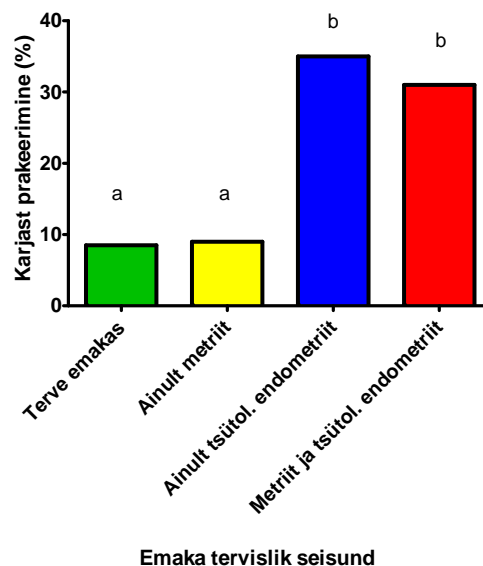
võrra. Seega, mediaan ajavahemik poegimisest tiinestumiseni oli edukalt ravitud lehmadel 85,5 päeva võrra lühem, võrreldes lehmadega, kellel metriidi ravi tulemust ei andnud. Aeg poegimisest tiinestumiseni pikenes oluliselt ka nendel lehmadel, kelle emakas oli esimese 3 poegimisjärgse nädala jooksul normaalne (metriiti ei esinenud), kuid kellel diagnoositi 40. poegimisjärgsel päeval tsütoloogiline endometriit. Mediaan ajavahemik poegimisest tiinestumiseni oli selles loomade rühmas 92 päeva võrra pikem, võrreldes lehmadega, kellel metriiti ja tsütoloogilist endometriiti ei esinenud.



Joonis 9. Kaplani-Meieri hinnang tiinestunud lehmade proportsioonile sõltuvalt poegimisjärgsetest päevadest (1) kliiniliselt ja tsütoloogiliselt terve emakaga lehmadel; (2) metriidiga lehmadel, kellel ei esinenud tsütoloogilist endometriiti (esimese 3 poegimisjärgse nädala jooksul ei diagnoositud metriiti; 40. poegimisjärgsel päeval oli emakas <8% neutrofiile), (3) tsütoloogilise endometriidiga lehmadel, kellel ei esinenud metriiti (esimese 3 poegimisjärgse nädala jooksul ei diagnoositud metriiti; 40. poegimisjärgsel päeval oli emakas >8% neutrofiile) ja (4) metriidi ja tsütoloogilise endometriidiga lehmadel (esimese 3 poegimisjärgse nädala jooksul diagnoositi metriit; 40. poegimisjärgsel päeval oli emakas >8% neutrofiile). Mediaan ajavahemik poegimisest tiinestumiseni oli tervetel lehmadel 95 päeva, metriidiga lehmadel, kellel 40. poegimisjärgsel päeval tsütoloogilist endometriiti ei esinenud 118,5 päeva (Log-rank statistik: 4,01; p=0,043), metriidita lehmadel, kellel 40. poegimisjärgsel päeval esines tsütoloogiline endometriit 187 päeva (Log-rank statistik: 13,72; p=0,0002) ja metriidiga lehmadel, kellel 40. poegimisjärgsel päeval diagnoositi tsütoloogiline endometriit 204 päeva (Log-rank statistik: 15,81; p<0,0001). Mustad märgid kõveratel tähistavad karjast praakeritud lehmi.

Emakapõletike mõju prakeerimisele

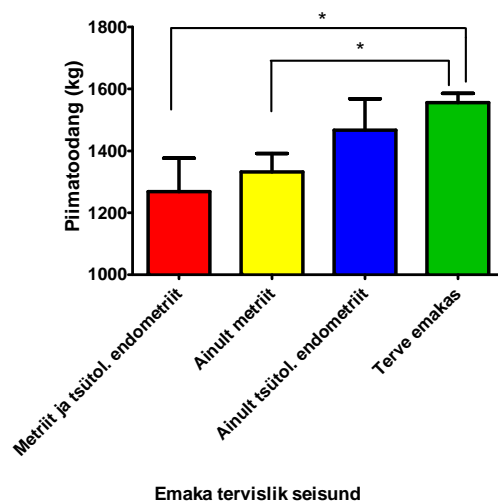
Emakapõletikud mõjutasid lehmade karjas hoidmist. Karjast prakeerimise peamiseks põhjuseks oli, metriidi olemasolust sõltumata, tsütoloogiline endometriit (joonis 10). Lehmadest, kellel esines nii metriit kui ka tsütoloogiline endometriit prakeeriti 31%. Lehmadest, kellel diagnoositi ainult tsütoloogiline endometriit prakeeriti 35%. Lehmadest, kellel esines ainult metriit, prakeeriti 9% ning lehmadest, kellel ei esinenud metriiti ega ka tsütoloogilist endometriiti prakeeriti 8,5%. Karjast prakeerimise risk oli metriidi ja tsütoloogilise endometriidiga lehmadel ja ainult tsütoloogilise endometriidiga lehmadel statistiliselt oluliselt kõrgem ($p < 0,05$), võrreldes terve lehmadega.



Joonis 10. Karjast prakeerimine ja emaka tervislik seisund. Erineva tähega tähistatud tulbad erinevad üksteisest oluliselt ($p < 0,05$).

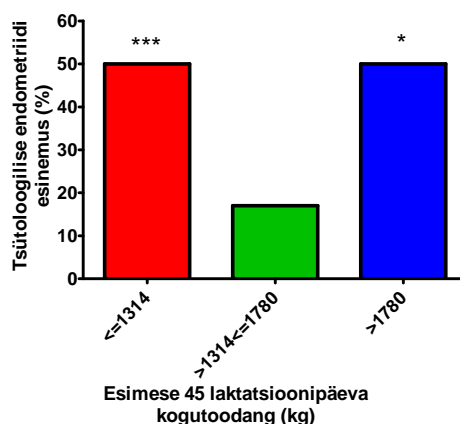
Emakapõletike seosed piimatoodanguga

Metriidiga kaasnes piimatoodangu langus. Lehmadel, kellel diagnoositi nii metriit kui ka tsütoloogiline endometriit, oli esimese 45 laktatsioonipäeva kogutoodang keskmiselt 288 kg võrra madalam ($p < 0,05$) ja lehmadel, kellel diagnoositi ainult metriit 224 kg võrra madalam ($p < 0,05$), võrreldes lehmadega, kellel ei esinenud metriiti ega ka tsütoloogilist endometriiti (joonis 11).



Joonis 11. Esimese 45 laktatsioonipäeva kogutoodang (keskmine \pm SEM) ja emaka tervislik seisund. Tärniga tähistatud tulbad erinevad üksteisest oluliselt ($p < 0,05$).

Tsütoloogilise endometriidi seos piimatoodanguga ei olnud lineaarne. Tsütoloogilise endometriidi esinemus oli kõrge ja madala piimatoodanguga lehmadel suurem ($p < 0,05$), võrreldes keskmise piimatoodanguga lehmadega (joonis 12).



Joonis 12. Tsütoloogilise endometriidi esinemus sõltuvalt esimese 45 laktatsioonipäeva kogutoodangust. Tärnid tulpadel viitavad statistilisele erinevusele, võrreldes keskmise tulbaga (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

Lehmadel, kelle esimese 45 laktatsioonipäeva kogutoodang oli väiksem kui 1314 kg ja lehmadel, kelle esimese 45 laktatsioonipäeva kogutoodang oli suurem kui 1780 kg, oli tsütoloogilise endometriidi esinemus 50%. Lehmadel, esimese 45 laktatsioonipäeva kogutoodanguga vahemikus 1314–1780 kg, oli tsütoloogilise endometriidi esinemus 17%. Tsütoloogilise endometriidi ja madala piimatoodanguga lehmadel esines sama laktatsiooni jooksul arvatavasti ka mõni muu piimatoodangut vähendav terviseprobleem - näiteks metriit või mastiit. Tsütoloogilise endometriidi suuremat esinemissagedust kõrge piimatoodanguga lehmadel selgitab nende sügavam negatiivne energiabilanss, mis pidurdab emakat kaitsva immuunvastuse teket.

Tsütoloogilise endometriidi ja vereplasma IGF1 sisalduse mõju ja koosmõju korduvpoeginud lehmade tiinestumisele ja karjast prakeerimisele

Kuna tsütoloogiline endometriit oli kõige olulisem korduvpoeginud lehmade tiinestumist vähendav ja karjast prakeerimise tõenäosust suurendav haigustest tingitud faktor ja vereplasma madal IGF1 sisaldus oli ainvahetusparameetritest kõige enam tiinestumist mõjutav tegur, siis analüüsisime tsütoloogilise endometriidi ja vereplasma IGF1 sisalduse mõju ja koosmõju korduvpoeginud lehmade tiinestumisele ja karjast prakeerimisele.

Esmalt tuvastasime mitmeparameetrilise logistilise regressioonanalüüsiga, et 150.-nda poegimisjärgse päeva tiinestumist mõjutasid oluliselt nii vereplasma IGF1 sisaldus 7. poegimisjärgsel päeval kui ka 40. poegimisjärgsel päeval diagnoositud tsütoloogiline endometriit (tabel 5).

Tabel 5. Lehmade 150. poegimisjärgse päeva tiinestumist mõjutavate faktorite mitmefaktorilise logistilise regressioonanalüüsi tulemused.

Mudel	Muutuja	Klass	Hinnang	Standard- viga	OR ¹	95% usaldus- vahemik	p-väärtus
Mudel 1 (AUC=0,74)	IGF1 - 7. poegimisjärgne päev	ng/ml	0,0293	0,012	1,030	1,007-1,054	0,0114
	PMN ² - 40. poegimisjärgne päev	%	-0,0265	0,008	0,974	0,958-0,990	0,0017
Mudel 2 (AUC=0,72)	IGF1 - 7. poegimisjärgne päev	> 33 ng/ml	1,420	0,516	4,12	1,497-11,312	0,0061
		≤ 33 ng/ml	Referent				
	PMN - 40. poegimisjärgne päev	>8%	Referent	0,455	0,30	0,121-0,719	0,0073
		≤8%	-1,222				

AUC - ROC-kõvera alune pind, mis näitab mudeli prognoosilist täpsust.

¹ Šansside suhe

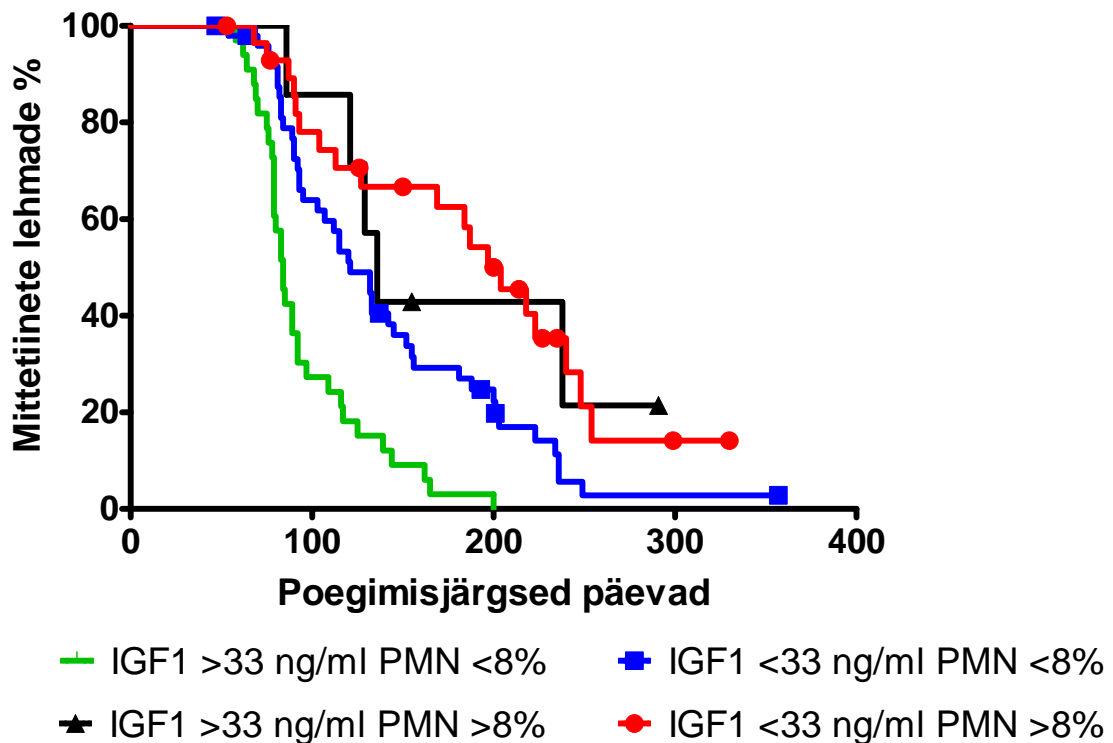
² polümorfonuklearsed neutrofiilid

Mudel 1 – IGF1 ja PMN pidev tunnus, Mudel 2 - IGF1 ja PMN dihhotoomne tunnus

Selgitamaks IGF1 ja tsütoloogilise endometriidi mõju sigivusele ja karjas püsimisele, jaotasime lehmad IGF1 sisalduse (madal - kõrge) ja tsütoloogilise endometriidi esinemuse alusel (esines - ei esinenud) 4 rühma: 1) tsütoloogilise endometriidita lehmad, kelle vereplasma IGF1 sisaldus oli >33 ng/ml; 2) tsütoloogilise endometriidiga lehmad, kelle vereplasma IGF1 sisaldus oli >33 ng/ml; 3) tsütoloogilise endometriidita lehmad, kelle vereplasma IGF1 sisaldus oli <33 ng/ml; 4) tsütoloogilise endometriidiga lehmad, kelle vereplasma IGF1 sisaldus oli <33 ng/ml.

IGF1 ja tsütoloogilise endometriidi seos tiinestumisega on toodud joonisel 13. Jooniselt 13 on näha, et kõige vähem kulus tiinestumiseks aega lehmadel, kelle IGF1 sisaldus oli >33 ng/ml ja kellel ei esinenud tsütoloogilist endometriiti. Seevastu kulus kõige rohkem aega tiinestumiseks lehmadel, kelle IGF1 sisaldus oli <33 ng/ml ja kellel diagnoositi tsütoloogiline endometriit. Vaatamata tsütoloogilise endometriidi puudumisele, mõjutas madal IGF1 sisaldus tiinestumist negatiivselt.

Samuti pikenes mediaan ajavahemik poegimisest tiinestumiseni lehmadel, kellel oli IGF1 sisaldus >33 ng/ml, kuid kellel diagnoositi tsütoloogiline endometriit.



Joonis 13. Kaplani-Meieri hinnang tiinestunud lehmade proportsioonile sõltuvalt hormoon IGF1 sisaldusest ja tsütoloogilise endometriidi esinemusest. Võrreldi 4 loomade rühma 1) tsütoloogilise endometriidita lehmadel, kelle vereplasma IGF1 sisaldus oli kõrge (IGF1 >33 ng/ml, PMN <8%); 2) tsütoloogilise endometriidita lehmadel, kelle vereplasma IGF1 sisaldus oli madal (IGF1 <33 ng/ml, PMN <8%); 3) tsütoloogilise endometriidiga lehmadel, kelle vereplasma IGF1 sisaldus oli kõrge (IGF1 >33 ng/ml, PMN >8%); 4) tsütoloogilise endometriidiga lehmadel, kelle vereplasma IGF1 sisaldus oli madal (IGF1 <33 ng/ml, PMN >8%). Mediaan ajavahemik poegimisest tiinestumiseni oli IGF1 >33 ng/ml, PMN <8% rühma lehmadel 84 päeva, IGF1 <33 ng/ml, PMN <8% rühma lehmadel 121 päeva (Log-rank statistik: 17,13; p <0,0001), IGF1 >33 ng/ml, PMN >8% rühma lehmadel 136 päeva (Log-rank statistik: 8,41; p <0,0037) ja IGF1 <33 ng/ml, PMN >8% rühma lehmadel 197 päeva (Log-rank statistik: 29,73; p <0,0001). Märkid kõveratel tähistavad karjast prakeeritud lehmi.

Lisaks analüüsisime IGF1 sisalduse ja tsütoloogilise endometriidi (PMN >8%) esinemuse alusel moodustatud loomarühmade jõudlus-, sigivus- ja tervisenäitajaid. Tulemused on esitatud tabelis 6. Tabelist 6 on näha, et rühma 1 (IGF1 >33 ng/ml ja PMN <8%) kuuluvate lehmade sigivuse, tervise ja karjas hoidmise näitajad olid, võrreldes teistesse rühmadesse kuuluvate lehmadega, kõige paremad. Tiinestumine esimesest seemendamisest oli selles loomade rühmas 73%, ajavahemik poegimisest tiinestumiseni 96 päeva ja prakeerimine 0%. Vastukaaluks olid kõige halvemad näitajad lehmadel, kelle vereplasma IGF1 sisaldus oli 7. poegimisjärgsel päeval <33 ng/ml ja kellel diagnoositi 40. poegimisjärgsel päeval tsütoloogiline endometriit (PMN >8%). Selles loomade rühmas oli tiinestumine esimesest seemendamisest 24%, ajavahemik poegimisest tiinestumiseni 156,4 päeva ja karjast prakeerimine 34%. Lehmade luteaalse aktiivsuse taastumine sõltus samuti

vereplasma IGF1 sisaldusest ja tsütoloogilise endometriidi esinemusest (tabel 6). Tabelist 6 on näha, et luteaalne aktiivsus taastus kõige hiljem loomade rühmas 4, kelle vereplasma IGF1 sisaldus oli 7. poegimisjärgsel päeval <33 ng/ml ja kellel diagnoositi 40. poegimisjärgsel päeval tsütoloogiline endometriit (PMN >8%). Saadud tulemus näitab, et pikk anovulatoorne periood e. anöstrus on põhjustatud negatiivsest energiabilansist kombineerituna emaka põletikulise seisundiga.

Tabel 6. Lehmade jõudlus-, sigivus- ja tervisenäitajad hormooni IGF1 sisalduse (ng/ml) ja neutrofiilide hulga (PMN, %) alusel moodustatud rühmades.

Mõõdetud parameeter	Rühm 1 (IGF1>33 ja PMN<8)		Rühm 2 (IGF1>33 ja PMN>8)		Rühm 3 (IGF1<33 ja PMN<8)		Rühm 4 (IGF1<33 ja PMN>8)		Rühma mõju statistiline olulisus (p-väärtus)
	Keskm. ±SEM	Erineb rühmadest	Keskm. ±SEM	Erineb rühmadest	Keskm. ±SEM	Erineb rühmadest	Keskm. ±SEM	Erineb rühmadest	
Aeg poegimisest luteaalse aktiivsuse taastumiseni, päeva	36.0 ± 1.04	3, 4	31.43 ± 2.12	3, 4	47.6 ± 0.98	1, 2, 4	65,8 ± 1.51	1, 2, 3	<0,001 [¤]
Aeg esimese seemendamiseni, päeva	79,2±2,62	4	83,3±5,68		83,7±2,22		87,7±3,01	1	0,214 [*]
Tiinestumine esimesest seemendamisest	0,73±0,08	2, 3, 4	0	1	0,38±0,07	1	0,24±0,09	1	<0,001 [*]
Ajavahemik poegimisest tiinestumiseni, päeva	96,1±1,71	2, 3, 4	142,0±5,33	1, 3, 4	131,1±1,75	1, 2, 4	156,4±2,87	1, 2, 3	<0,001 [¤]
Haiguste esinemise tõenäosus	0,27±0,08	4	0,57±0,19		0,40±0,07		0,62±0,09	1	0,050 [#]
Prakeerimise tõenäosus	0	2, 3, 4	0,29±0,17	1	0,14±0,05	1, 4	0,34±0,09	1, 3	<0,001 ⁺

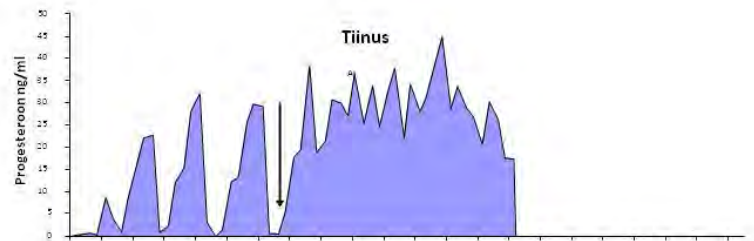
^{*} dispersioonanalüüs, [#] logit-seosefunktsiooniga üldistatud lineaarne mudel, [¤] logaritmi-seosefunktsiooniga üldistatud lineaarne mudel, ⁺ Fisher'i täpne test

Tsütoloogilise endometriidi seosed munasarjafunktsiooni häiretega

Munasarjafunktsiooni häirete kindlakstegemiseks kaardistati piima progesterooniprofiilide abil 130 lehma munasarjafunktsioon alates poegimisest kuni 65. tiinuspäevani või karjast prakeerimiseni. Munasarjafunktsioon klassifitseeriti vastavalt joonisel 14 toodud kriteeriumitele: normaalne munasarjafunktsioon; pikenenud anovulatoorne periood; innatsükli katkemine; pikenenud luteaalfaas 1 ja pikenenud luteaalfaas 2.

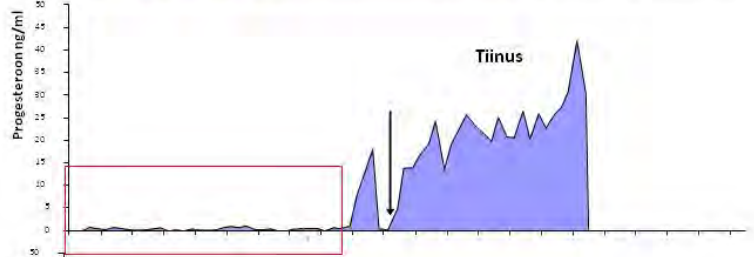
Normaalne munasarjafunktsioon

Luteaalfunktsioon taastub <50 poegimisjärgse päeva jooksul ning innatsükliid on normaalse (18-24 päeva) pikkusega.



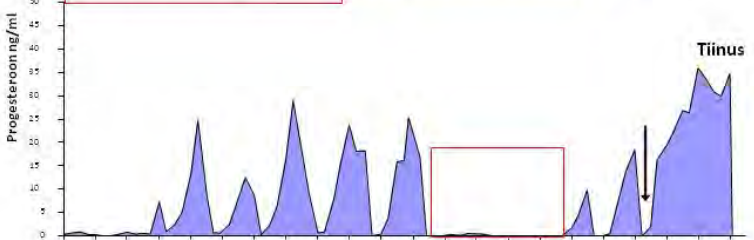
Pikenenud anovulatoorne periood

Luteaalfunktsiooni taastumiseks poegimisjärgselt kulub >50 päeva.



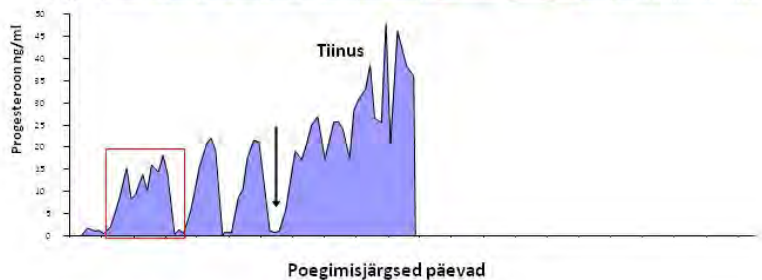
Innatsükli katkemine

Luteaalfunktsioon taastub <50 poegimisjärgse päeva jooksul, innatsükliid on normaalse pikkusega, kuid normaalne tsükliilisus katkeb.



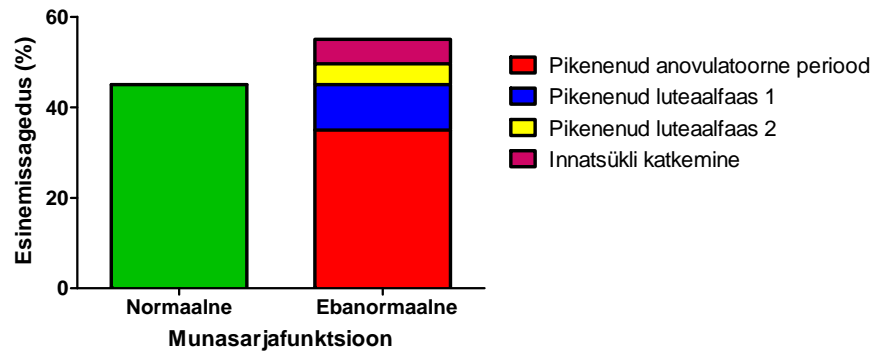
Pikenenud luteaalfaas

Lehmadel esineb normaalsest pikem (> 19 päeva) luteaalfaas. Kui poegimisjärgselt esimene luteaalfaas on pikem = pikenenud luteaalfaas 1; Kui pikenenud luteaalfaas esineb hiljem = pikenenud luteaalfaas 2.

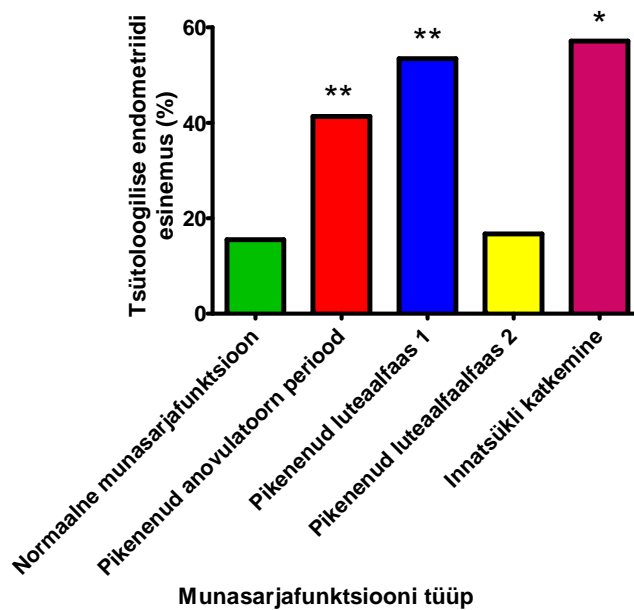


Joonis 14. Munasarjafunktsiooni klassifitseerimise kriteeriumid.

Uuritud lehmadest oli normaalse munasarjafunktsiooniga 45% (joonis 15). Enamesinevaks munasarjafunktsiooni häireks oli pikenenud anovulatoorne periood (35%), millele järgnesid pikenenud luteaalfaas (14,6%) ja innatsükli katkemine (5,4%).



Joonis 15. Multipaarsete lehmade (n=130) munasarjafunktsioon alates poegimisest kuni tiinestumise või karjast prakeerimiseni.



Joonis 16. Tsütoloogilise endometriidi esinemus sõltuvalt munasarjafunktsiooni tüübist.

Tsütoloogilise endometriidi esinemus sõltus lehmade munasarjafunktsioonist (joonis 16). Normaalse munasarjafunktsiooniga lehmadel oli tsütoloogilise endometriidi esinemus 15,5%. Pikenenud anovulatoorse perioodiga, esimest tüüpi pikenenud luteaalfaasiga ja innatsükli katkemisega lehmadel oli tsütoloogilise endometriidi esinemus statistiliselt oluliselt kõrgem, võrreldes normaalse munasarjafunktsiooniga lehmadega, vastavalt 41,3% ($p=0,004$), 53,4% ($p=0,007$) ja 57,1% ($p=0,025$). Tsütoloogilise endometriidi esinemus teist tüüpi pikenenud

luteaalfaasiga lehmadel ei erinenud normaalse munasarja funktsiooniga lehmadest (16,7%; $p=1,0$). Saadud tulemus näitab, et munasarjafunktsiooni häiretega, välja arvatud pikenenud luteaalfaas 2, kaasneb tsütoloogilise endometriidi kõrgem esinemus, mis võibki olla üheks põhjuseks, miks munasarjafunktsiooni häiretega lehmade tiinestumine on madalam, võrreldes normaalse munasarjafunktsiooniga lemadega. Tsütoloogilise endometriidi kõrgem esinemus munasarjafunktsioonihäiretega lehmadel lubab oletada, et tsütoloogiline endometriit on munasarjafunktsioonihäirete riskiteguriks.

Kokkuvõte ja järeldused

Korduvpoeginud lehmade sigivus ja karjas püsimine sõltusid hormoon IGF1 sisaldusest 7. poegimisjärgsel päeval ja tsütoloogilise endometriidi esinemusest 40. poegimisjärgsel päeval. Vereplasma IGF1 sisaldus ja emaka endomeetriumi neutrofiilide osakaal osutusid olulisteks lehmade sigivust ja karjas hoidmist prognoosivateks biomarkeriteks. Tsütoloogiline endometriit oli korduvpoeginud lehmadel tiinestumist vähendav ja karjast prakeerimise tõenäosust suurendav kõige olulisem faktor. Metriit mõjutas negatiivselt lehmade piimatoodangut, tiinestumist ja karjas hoidmist. Metriidi mõju tiinestumisele ja prakeerimisele sõltus metriidi ravi edukusest ehk tsütoloogilise endometriidi esinemusest. Endomeetriumi tsütouuringuga on võimalik hinnata metriidi ravi tulemuslikkust. Lähtudes uuringu tulemustest, et tsütoloogiline endometriit ja madal vereplasma IGF1 sisaldus vähendavad oluliselt lehmade tiinestumist ja karjas hoidmist, on tiinestumisprobleemidega karjades õigustatud endometriidi tsütoloogiline seire ja vereplasma IGF1 sisalduse monitooring. Kuna tsütoloogiline endomeetriit vähendab väga oluliselt lehmade tiinestumist ja karjas hoidmist, siis oleks otstarbekas välja töötada abiõude programm tsütoloogilise endometriidi vähendamiseks piimakarjades.

Tsütoloogilise endometriidi riskitegurid

Kuna tsütoloogiline endometriit oli korduvpoeginud lehmade madala tiinestumise ja karjast prakeerimise kõige olulisem riskitegur, siis töö järgmiseks ülesandeks võtsime välja selgitada tsütoloogilise endometriidi tekkimise riskitegurid ehk leida vastus küsimusele, miks mõnedel lehmadel tekib tsütoloogiline endometriit, teistel aga mitte. Uurisime ainevahetushormoonide, energiametaboliitide, põletikumarkerite, maksaensüümide, looma vanuse, piimatoodangu, kliiniliste haiguste ja häirete ning kehakonditsiooni mõju tsütoloogilise endometriidi tekkimise riskile.

Ainevahetushormoonide, põletikumarkerite, vere metaboliitide kontsentratsioonide ja tsütoloogilise endometriidi andmete (kas endometriit esines või ei esinenud) ROC-kõvera analüüsil leiti iga ainevahetushormooni, põletikumarkeri ja vere metaboliidi jaoks optimaalne piirväärtus, mida kasutades oleks võimalik prognoosida tsütoloogilisse endometriiti haigestumise riski. Kõik muutujad ROC-kõvera aluse pinnaga $<0,6$ arvati edaspidisest analüüsist välja. Analüüsi tulemused on esitatud tabelis 7.

Tabel 7. Vereplasmast määratud ainevahetushormoonide, põletikumarkerite ja vere metaboliitide optimaalsed kontsentratsioonid prognoosimaks tsütoloogilisse endometriiti haigestumise riski korduvpoeginud eesti holsteini tõugu lehmadel. Märki suund enne optimaalse piirväärtuse kontsentratsiooni viitab kõrgema tsütoloogilise endometriidi esinemusega rühmale. Tabelis on esitatud muutujad ROC-kõvera aluse pinnaga $>0,6$.

Vereproovi võtmise aeg	Muutuja	AUC ¹	Piirväärtus	Se, ² %	Sp, ³ %	OR ⁴	95% usaldusvahemik	p-väärtus
14 päeva EP*	IGF1	0,67	<74,62 ng/ml	0,58	0,75	4,13	1,81-9,45	<0,001
	Haptoglobiin	0,65	>0,075 mg/ml	0,83	0,42	3,65	1,37-9,71	0,011
	NEFA	0,63	>107,5 µekv/l	0,69	0,59	3,28	1,42-7,54	0,005
7 päeva PP**	IGF1	0,71	<13,24 ng/ml	0,64	0,77	5,96	2,54-3,96	<0,001
	Haptoglobiin	0,74	>0,805 mg/ml	0,72	0,71	6,39	2,68-5,26	<0,001
	Albumiin	0,62	<36,45 g/L	0,61	0,65	2,96	1,30-6,57	0,009
	Kolesterool	0,63	<2,145 mmol/L	0,56	0,65	2,33	1,05-5,17	0,044
	SAA	0,64	>128	0,35	0,94	9,13	2,05-40,76	<0,001
21 päeva PP	IGF1	0,67	<36,49 ng/ml	0,64	0,69	3,88	1,70-8,84	0,012
	Albumiin	0,69	<38,1 g/L	0,75	0,57	3,92	1,64-9,35	0,002
	Kaltsium	0,66	<2,425 mmol/L	0,72	0,54	3,08	1,32-7,12	0,009
	Insuliin	0,64	<0,33 ng/ml	0,56	0,67	2,59	1,16-5,78	0,025

¹ ROC-kõvera alune pind; ² Tundlikkus; ³ Spetsiifilisus; ⁴ Šansside suhe; EP* = enne poegimist; PP** = pärast poegimist

Tabelist 7 on näha, et enne poegimist võetud vereproovidest oli tsütoloogilisse endometriiti haigestumise riskiga seotud vereplasma IGF1, haptoglobiin ja NEFA; 7 poegimisjärgsel päeval haptoglobiin, IGF1, albumiin, kolesterool ja SAA ning 21. poegimisjärgsel päeval IGF1, albumiin, kaltsium ja insuliin. Tabelist 7 on samuti näha, et erineval vereproovi võtmise ajal omasid prognostilist väärtust erinevad muutujad. Muutuja optimaalne piirväärtus sõltus proovi võtmise ajast. Näiteks IGF1 korral oli tsütoloogilisse endometriiti haigestumise prognoosimise optimaalseks

piirväärtuseks enne poegimist 74,62 ng/ml, 7. poegimisjärgsel päeval 13,24 ng/ml ja 21. poegimisjärgsel päeval 36,49 ng/ml.

Kui Tabelis 7 toodud muutujaid analüüsiti mitmefaktorilise logistilise regressioonanalüüsiga, siis tsütoloogilisse endometriiti haigestumisega osutus seotuks ainult enne poegimist analüüsitud IGF1; 7.-ndal poegimisjärgsel päeval analüüsitud muutujatest jäid mudelisse haptoglobiin ja IGF1 ning 21. poegimisjärgsel päeval analüüsitud muutujatest IGF1 ja albumiin (tabel 8).

Tabel 8. Viieteistkümnendal poegimiseelsel päeval, 7. ja 21. poegimisjärgsel päeval määratud eesti holsteini tõugu lehmade vereplasma metaboliitide kontsentratsioonide seosed tsütoloogilisse endometriiti haigestumise riskiga. Mitmefaktorilise logistilise regressioonanalüüsi tulemused.

Mudel*	Muutuja	Klass	Hinnang	Standard- viga	OR ¹	95% usaldus- vahemik	p-väärtus
-15 p mudel (AUC [#] =0,67)	IGF1	<74,62 ng/ml	1,42	0,42	4,13	1,81-9,45	<0,001
		≥74,62 ng/ml	Referent				
7 p mudel (AUC=0,78)	IGF1	<13,24 ng/ml	1,7	0,46	3,57	1,44-8,89	0,007
		≥13,24 ng/ml	Referent				
	Haptoglobiin	≤0,805 mg/ml	Referent	0,47	4,37	1,74-11,00	0,002
>0,805 mg/ml	1,47						
21 p mudel (AUC=0,72)	IGF1	<36,49 ng/ml	1,08	0,44	2,95	1,26-6,91	0,014
		≥36,49 ng/ml	Referent				
	Albumiin	<38,1 g/L	1,15	0,46	3,16	1,28-7,78	0,014
≥38,1 g/L	Referent						

* Kõik tsütoloogilise endometriidiga seotud vereplasma muutujad Tabelist 1 lisati mitmefaktorilise logistilise regressioonanalüüsi mudelitesse. Muutujad olulisuse nivooaga P<0.05 igal proovivõtmise perioodil jäeti mudelisse.

AUC - ROC-kõvera alune pind, mis näitab mudeli prognostilist täpsust.

¹ Šansside suhe

Järgmisena selgitasime lehmade vanuse, kehakonditsiooni, haiguste ja piimatoodangu seosed tsütoloogilisse endometriiti haigestumise riskiga. Tabelist 9 on näha, et poegimiseelne madalam kehakonditsioon, poegimisega seotud haigused ja häired, lehmade kõrgem vanus ning nii madal kui ka kõrge piimatoodang olid tsütoloogilisse endometriiti haigestumise riskiteguriteks.

Tabel 9. Tsütoloogilisse endometriiti haigestumise riskitegurite analüüs. Ühefaktorilise logistilise regressioonanalüüsi tulemused.

Muutuja	Klass	Hinnang	Standard- viga	Šansside suhe	95% usaldus- vahemik	p-väärtus
Poegimiseelne kehakonditsioon (AUC [#] = 0,61)	<3,0	1,75	0,78	5,76	1,23-27,00	0,027
	3,0 või 3,25	0,80	0,55	2,22	0,75-6,58	0,148
	3,5 või 3,75	Referent				
Poegimisega seotud häired ja haigused (AUC = 0,63)	Ei esinenud	Referent				
	Esinesid	1,07	0,41	2,93	1,31-6,56	0,008
Laktatsioon (AUC = 0,60)	2. laktatsioon	Referent				
	≥3. laktatsioon	0,84	0,41	2,32	1,03-5,23	0,043
45 poegimisjärgse päeva kumulatiivne piimatoodang (kg) (AUC = 0,75)	<1314	2,06	0,51	7,81	2,90-21,06	<0,001
	1314 – 1780	Referent				
	≥1780	2,35	0,62	10,54	3,12-35,54	<0,001

AUC - ROC-kõvera alune pind, mis näitab mudeli prognostilist täpsust.

Lõpuks koostasime mitmefaktorilised regressioonanalüüsi mudelid, kus muutujatena arvati mudelitesse vereplasma analüüdid tabelist 8 (IGF1, haptoglobiin, albumiin) ja muutujad tabelist 9 (poegimiseelne kehakonditsioon, laktatsioon, piimatoodang ja poegimisega seotud häired ja haigused). Mudelid koostati -14., 7. ja 21. päeva jaoks eraldi. Tulemused on esitatud tabelis 10. Tabelist 10 on näha, et vereplasma analüütidest olid tsütoloogilisse endometriiti haigestumise riskiga seotud madal IGF1 enne poegimist, madal IGF1 ja kõrge haptoglobiinisaldus 7. poegimisjärgsel päeval ning madal albumiinisaldus 21. poegimisjärgsel päeval. Teistest mõõdetud parameetritest olid tsütoloogilisse endometriiti haigestumise riskiteguriteks madal poegimiseelne kehakonditsioon, poegimisega seotud haigused ja häired ning nii madal kui ka kõrge piimatoodang. Mitmefaktorilistes logistilistes regressioonanalüüsi mudelites puudus lehma vanuse ja tsütoloogilisse endometriiti haigestumise vaheline seos.

Tabel 10. Mitmefaktoriliste logistiliste regressioonanalüüside tulemused

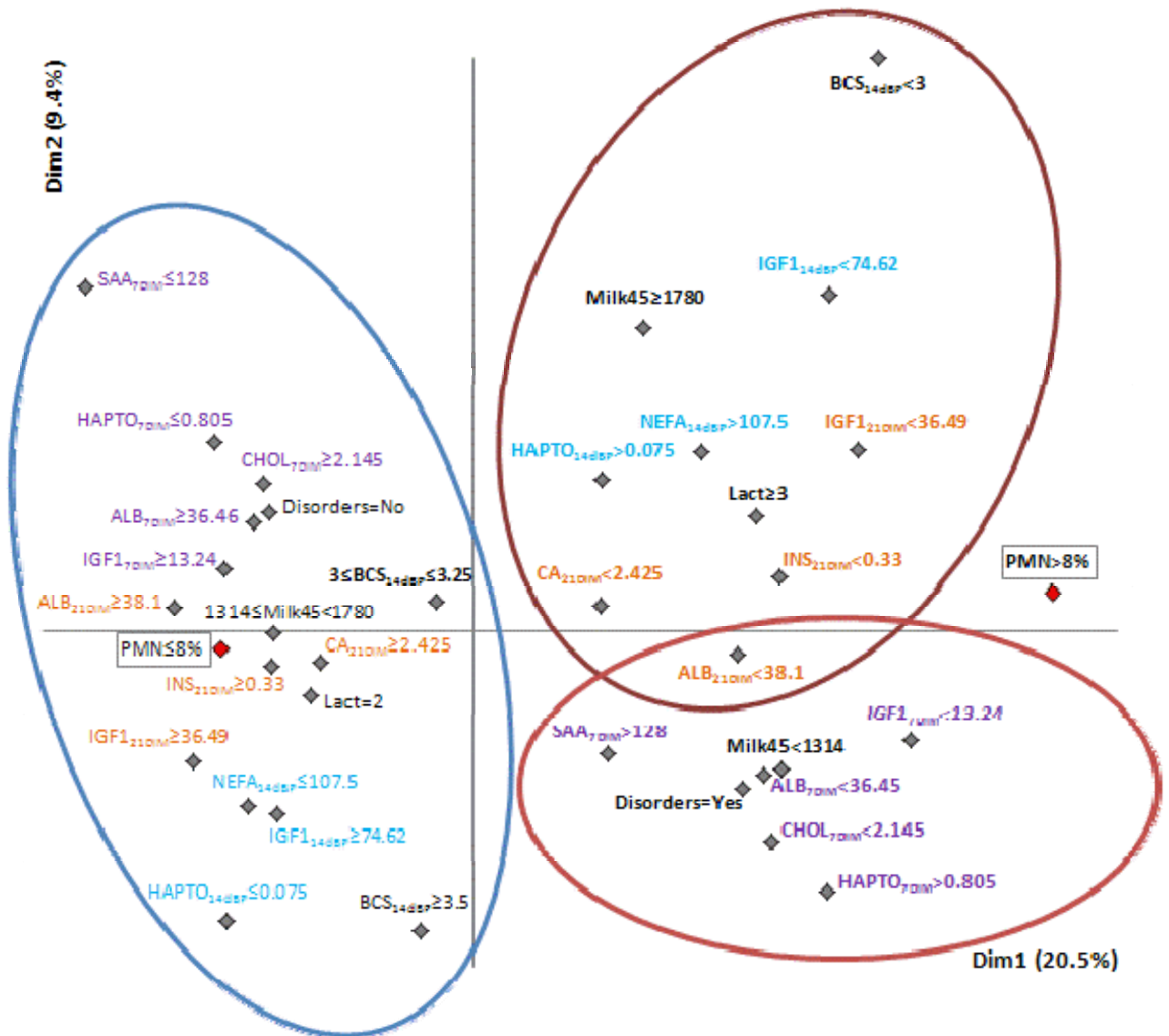
Mudel*	Muutuja	Klass	Hinnang	Standard- viga	Šansside suhe	95% usaldus- vahemik	p-väärtus
-14 p mudel (AUC [#] =0,85)	Kehakonditsioon 15 päeva enne poegimist	<3,0	2,33	0,98	10,28	1,49-70,84	0,020
		3,0 ja 3,25	1,00	0,64	2,71	0,78-9,43	0,120
		3,5 ja 3,75	Referent				
	Poegimisega seotud häired ja haigused	Ei esinenud	Referent				
		Esines	1,41	0,59	4,09	1,28-13,06	0,019
	45 poegimisjärgse päeva kumulatiivne piimatoodang	<1314	1,69	0,57	5,44	1,78-16,62	0,004
1314 – 1780		Referent					
IGF1	≥1780	2,74	0,73	15,45	3,68-64,87	<0,001	
	<74,62 ng/ml	1,07	0,51	2,90	1,06-7,92	0,040	
	≥74,62 ng/ml	Referent					
7 p mudel (AUC=0,89)	Kehakonditsioon 15 päeva enne poegimist	<3,0	2,98	1,06	19,78	2,46-159,14	0,006
		3,0 – 3,25	1,23	0,69	3,41	0,88-13,29	0,079
		3,5 – 3,75	Referent				
	Poegimisega seotud häired ja haigused	Ei esinenud	Referent				
		Esines	1,14	0,63	3,14	0,91-10,88	0,071
	45 poegimisjärgse päeva kumulatiivne piimatoodang	<1314	1,91	0,64	6,78	1,95-23,64	0,003
1314 – 1780		Referent					
IGF1	≥1780	2,53	0,81	12,52	2,57-60,93	0,002	
	<74,62 ng/ml	1,05	0,59	2,86	0,89-9,18	0,077	
	≥74,62 ng/ml	Referent					
Haptoglobiin	≤0,805 mg/ml	Referent					
	>0,805 mg/ml	1,60	0,58	4,95	1,60-15,32	0,006	
21 p mudel (AUC=0,87)	Kehakonditsioon 15 päeva enne poegimist	<3,0	2,57	1,02	13,13	1,77-97,29	0,013
		3,0 – 3,25	0,99	0,66	2,69	0,74-9,84	0,137
		3,5 – 3,75	Referent				
	Poegimisega seotud häired ja haigused	Ei esinenud	Referent				
		Esines	1,82	0,63	6,17	1,78-21,43	0,005
	45 poegimisjärgse päeva kumulatiivne piimatoodang	<1314	1,82	0,58	6,19	1,98-19,34	0,002
1314 – 1780		Referent					
Albumiin	≥1780	3,61	0,87	36,79	6,64-203,81	<0,001	
	<38,1 g/L	1,85	0,60	6,34	1,94-20,72	0,002	
	≥38,1 g/L	Referent					

* Mudelitesse lisati kõik muutujad Tabelitest 4 ja 5. Lõplikesse mudelitesse jäeti muutujad p-väärtusega < 0,1.

AUC - ROC-kõvera alune pind, mis näitab mudeli prognostilist täpsust.

Tsütoloogilise endometriidi riskitegurite mitmene korrespondentsanalüüs

Tsütoloogilise endometriidi riskifaktorite omavaheliste seoste paremaks mõistmiseks viisime läbi mitmese korrespondentsanalüüsi, mille tulemused on esitatud joonisel 17.



Joonis 17. Tsütoloogilise endometriidi riskitegurite korrespondentsanalüüs. $PMN \leq 8\%$ = terve emakas; $PMN \geq 8\%$ = tsütoloogiline endometriit. Analüüsis kasutati muutujatena tsütoloogilise endometriidi riskiga statistiliselt oluliselt seotud ning ROC kõverate abil dihotomiseeritud ainevahetushormoonide, põletikumarkerite ja vere metaboliitide optimaalseid kontsentratsioone. Alaindeksid ja erinevad värvid joonisel tähistavad vereproovi võtmise erinevaid ajahetki (dbp - enne poegimist; DIM - pärast poegimist). SAA – seerumialbumiin A; HAPTO – haptoglobiin; CHOL – kolesterool; ALB – albumiin; IGF1 – insuliinilaadne kasvufaktor 1; NEFA – esterifitseerimata rasvhapped; INS – insuliin; CA – kaltsium; BCS – kehakonditsioon; Milk45 – esimese 45 laktatsioonipäeva kumulatiivne piimatoodang; Disorders – poegimisega kaasnevad häired ja haigused.

Jooniselt 17 on näha, et esmajärjekorras (so joonise horisontaalsihis) eristusid üksteisest tsütoloogilise endometriidiga ja terved loomad. Joonise vasakul pool paiknevasse tsütoloogilise

endometriidi diagnoosita lehmade klastrisse kuulusid keskmise piimatoodanguga (esimese 45 laktatsioonipäeva piimatoodang >1314 kg ja >1780 kg) nooremad (2. laktatsioon), kõrgema poegimiseelse kehakonditsiooniga ja soodsa metaboliitide kontsentratsiooniga lehmad.

Tsütoloogilise endometriidi diagnoosiga loomad (joonise parem pool) jagunesid aga omakorda küllalt selgelt kahte klastrisse. Esimesse haigete loomade klastrisse kuulusid madala poegimiseelse kehakonditsiooniga (<3), vanemad (≥ 3 lakt), kõrge piimatoodanguga (esimese 45 laktatsioonipäeva piimatoodang ≥ 1780 kg), ebasoodsa poegimiseelse metaboliitide kontsentratsiooniga (madalam IGF1, kõrgem NEFA ja HP) ja ebasoodsa poegimisjärgse metaboliitide kontsentratsiooniga (madalam IGF1, insuliin ja kaltsium) lehmad. Teise haigete loomade klastrisse kuulusid poegimishäiretega ja/või kliiniliste haigustega, madala piimatoodanguga (esimese 45 laktatsioonipäeva piimatoodang ≤ 1314 kg) ja ebasoodsa 7. poegimisjärgsel päeval määratud metaboliitide kontsentratsiooniga (madalam IGF1, albumiin ja kolesterool; kõrgem HP ja SAA) lehmad.

Saadud tulemustele toetudes saab järeldada, et tsütoloogilisse endometriiti haigestub kaks täiesti erinevat tüüpi loomade rühma: 1. poegimishäiretega ja/või kliiniliselt haiged madala piimatoodanguga loomad ja 2. kliiniliselt terved kõrge piimatoodanguga loomad.

Tsütoloogilise endometriidi suuremat esinemissagedust kõrge piimatoodanguga kliiniliselt tervetel lehmadel selgitab nende sügavama negatiivse energiabilansiga kaasnev metaboolne stress, mis pidurdab emakat kaitsva immuunvastuse teket.

Järeldused, soovitused ja ettepanekud

Korduvpoeginud lehmade kõige sagedamini esinevateks haigusteks olid emakapõletikud. Pooltel uuritud lehmadest diagnoositi kas metriit, tsütoloogiline endometriit või samal lehmal esinesid mõlemad emakapõletiku vormid. Teiste haiguste esinemus oli madalam. Kahekümne kahel protsendil lehmadest kaasnes emakapõletikega ka mõni muu kliiniline haigus (päraste peetus, hüpokaltseemia, mastiit, tugev longe). Lehmad, kellel emakapõletikke ei diagnoositud, olid üldjuhul terved.

Korduvpoeginud lehmade sigivust ja karjast hoidmist mõjutas kõige enam tsütoloogiliselt diagnoositud endometriit, mida esines käesolevas uuringus 30% lehmadest. Tsütoloogilisse endometriiti haigestumise riskiteguriteks oli madal poegimiseelne energiatase, poegimisjärgne tugev põletikureaktsioon, kliinilised haigused ning nihästi kõrge kui ka madal piimatoodang.

Tsütoloogilisse endometriiti haigestus kaks täiesti erinevat tüüpi loomade rühma: 1. poegimishäiretega ja/või kliiniliselt haiged madala piimatoodanguga loomad ja 2. kliiniliselt terved kõrge piimatoodanguga loomad. Tsütoloogilise endometriidi suuremat esinemissagedust kõrge piimatoodanguga kliiniliselt tervetel lehmadel selgitab nende sügavama negatiivse energiabilansiga kaasnev metaboolne stress, mis pidurdab emakat kaitsva immuunvastuse teket. Tsütoloogilise endometriidi tekkimise riskitegurite teadmine võimaldab välja töötada strateegiaid tsütoloogilisse endometriiti haigestumise vähendamiseks ja seeläbi piimalehmade sigivuse parandamiseks. Poegimiseelse madala energiataseme ja tugeva poegimisjärgse põletikureaktsiooni riskitegurid, vajavad väljaselgitamist edaspidistes uuringutes.

Metriit mõjutas negatiivselt lehmade piimatoodangut, tiinestumist ja karjas hoidmist. Metriidi mõju tiinestumisele ja prakeerimisele sõltus metriidi ravi edukusest ehk tsütoloogilise endometriidi esinemusest 40. poegimisjärgsel päeval. Endomeetriumi tsütouuringuga on võimalik hinnata metriidi ravi tulemuslikkust.

Pikenenud anovulatoorne periood e. anöstrus on kordupoeginud lehmade kõige olulisem poegimisjärgne munasarjafunktsiooni häire, mida esines 35% lehmadest. Eriti halvasti mõjus luteaalfunktsiooni taastumise ajale negatiivne energiabilanss, millega kaasnes tsütoloogiline endometriit. Anöstruse probleemi lahendamiseks on vajalik vähendada poegimisjärgselt sügava negatiivse energiabilansiga loomade ja tsütoloogilise endometriidiga loomade osatähtsust karjas.

Hormoon IGF1 kontsentratsioon ja emaka endomeetriumi neutrofiilide osatähtsus osutusid kordupoeginud piimalehmade sigivuse ja karjas püsimise edukuse headeks prognostiliteks markeriteks.

Lähtudes uuringu tulemustest, et tsütoloogiline endometriit ja madal vereplasma IGF1 sisaldus vähendavad oluliselt lehmade tiinestumist ja karjas hoidmist, on tiinestumisprobleemidega karjades õigustatud endometriidi tsütoloogiline seire ja vereplasma IGF1 sisalduse monitooring. Kuna tsütoloogiline endomeetriit vähendab väga oluliselt lehmade tiinestumist ja karjas hoidmist, siis oleks otstarbekas välja töötada abiõude programm tsütoloogilise endometriidi vähendamiseks piimakarjades.

Tsütoloogilisse endometriiti haigestumise riski vähendamiseks on vajalik tagada kinnislehmadele optimaalne poegimiseelne kehakonditsioon, mis käesoleva uuringu tulemustele toetudes võiks olla

vahemikus 3,5-3,75. Väga oluline on vältida poegimiseelset madalat kehakonditsiooni (<3,0), sest poegimiseelse madala kehakonditsiooniga lehmadel kasvab oluliselt tsütoloogilisse endometriiti haigestumise risk. Madala poegimiseelse kehakonditsiooniga (<3,0) lehmadest diagnoositi 54% tsütoloogiline endometriit. Võrdluseks oli tsütoloogilise endometriidi esinemus keskmise kehakonditsiooniga (3,0-3,25) lehmadel 32% ja optimaalse kehakonditsiooniga (3,5-3,75) lehmadel 17%.

Ettepanekud edaspidisteks uuringuteks

Kuna tsütoloogiline endometriit ja madal vereplasma IGF1 sisaldus olid kõige olulisemed korduvpoeginud lehmade tiinestumist ja karjas hoidmist mõjutavad tegurid, siis oleks edaspidi otstarbekas selgitada tsütoloogilisse endometriiti haigestumise ja madala IGF1 kontsentratsiooni geneetilisi faktoreid.

Kirjandus

Dobson H., Walker S.L., Morris M.J., Routly J.E., Smith R.F. 2008. Why is it getting more difficult to successfully artificially inseminate dairy cows? *Animal*, 8, 1104-1111.

Duffield, T.F., Lissemore, K.D., McBride, B.W., Leslie, K.E. 2009. Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. *J. Dairy Sci.* 92., 571-580.

Chapinal, N., LeBlanc, S.J., Carson, M.E., Leslie, K.E., Godden, S., Capel, M., Santos, J.E.P., Overton, M.W., Duffield, T.F. 2012. Herd-level association of serum metabolites in the transition period with disease, milk production, and early lactation reproductive performance. *J. Dairy Sci.*, 95, 5676-5682.

Ferguson J.D., Galligan D.T., Thomsen N. 1994. Principal descriptors of body condition score in Holstein cows. *J Dairy Sci.* 77:2695-703.

Galvão K.N., Frajblat M., Butler W.R., Brittin S.B., Guard C.L., Gilbert R.O. 2010. Effect of early postpartum ovulation on fertility in dairy cows. *Reprod. Domest. Anim.* 45: 207-211.

Gutierrez C. G., Gong J. G., Bramley T. A., Webb R. 2006. Selection on the predicted breeding value for milk production delays ovulation independently of changes in follicular development, milk production and body weight. *Anim. Reprod. Sci.* 95:193–205.

Huzzey, J.M., Duffield, T.F., LeBlanc, S.J., Veira, D.M., Weary, D.M., von Keyserlingk, M.A.G. 2009. Short communication: Haptoglobin as an early indicator of metritis. *J. Dairy Sci.*, 92, 621-625.

- Inchaisri, C., Jorritsma, R., Vos, P.L., van der Weijden, G.C., Hogeveen, H. 2010. Economic consequences of reproductive performance in dairy cattle. *Theriogenology*, 74, 835-846.
- Ingvartsen KL, Andersen JB. 2000. Integration of metabolism and intake regulation: a review focusing on periparturient animals. *J Dairy Sci.*, 83,1573-97.
- Moyes, K.M., Larsen, T., Friggens, N.C., Drackley, J.K., Ingvartsen, K.L. 2009. Identification of potential markers in blood for the development of subclinical and clinical mastitis in dairy cattle at parturition and during early lactation. *J. Dairy Sci.*, 92, 5419-5428.
- Nyman A.K., Emanuelson U., Holtenius K., Ingvartsen K.L., Larsen T., Waller K.P. 2008. Metabolites and immune variables associated with somatic cell counts of primiparous dairy cows. *J Dairy Sci.*, 91, 2996-3009.
- Ospina, P.A., Nydam, D.V., Stokol, T., Overton, T.R. 2010. Evaluation of nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases. *J. Dairy Sci.*, 93, 546-554.
- Seifi, H.A., LeBlanc, S.J., Leslie, K.E., Duffield, T.F. 2011. Metabolic predictors of post-partum disease and culling risk in dairy cattle. *The Veterinary Journal*, 188, 216-220.
- Sprecher, D.J., Hostetler, D.E., Kaneene, J.B. 1997. A lameness scoring system that uses posture and gait to predict dairy cattle reproductive performance. *Theriogenology*, 15, 1179-1187.
- Velazquez, M.A., Spicer, L.J., Wathes, D.C. 2008. The role of endocrine insulin-like growth factor-I (IGF-I) in female bovine reproduction. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 35, 325-342.
- Vangroenweghe, F., Lamote, I., Burvenich, C. 2005. Physiology of the periparturient period and its relation to severity of clinical mastitis. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 29, 283-293.
- Waldmann, A. 1999. Monoclonal antibodies to progesterone: characterization and selection for enzyme immunoassay in bovine milk. *Hybridoma*, 18, 289-296.
- Wathes DC, Fenwick M, Cheng Z, Bourne N, Llewellyn S, Morris DG, Kenny D, Murphy J, Fitzpatrick R. 2007. Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow. *Theriogenology*;68 Suppl 1:S232-41.