

PROJEKTI LÕPPARUANNE⁵

1. VALDKONNA NIMETUS: Toiduohutus ja veterinaaria

2. PROJEKTI NIMETUS: „Poegimisjärgsete emakainfektsioonide tõrje meetodika ja raviskeemide täiustamine Eesti kõrgetoodangulistel piimalehmadel.”

3. PROJEKTI NIMETUS inglise keeles: „Improvement of acute puerperal metritis treatment regims and methodology in Estonian high production dairy herd”.

4. PROJEKTI KESTUS	Algus: 01.01. 2006	Lõpp: 31.12. 2007
--------------------	--------------------------	-------------------------

5. PROJEKTI TÄITJA: Eesti Maaülikool

Telefon: 7 313 706

Aadress: Tartu Kreutzwaldi 1 51014

Registrikood: 74001086

Pangarekviisidid: SEB Eesti Ühispank arveldusarve: 101020000308001

6. PROJEKTI JUHT:	Kalle Kask (Ees- ja perekonnanimi)	Professor, veterinaarmeditsiini doktor (Ametikoht, teaduskraad)
-------------------	---------------------------------------	--

7. RAHASTAMISE ALUS: Töövõtulepingud nr. 3.4-23/75 22. märts 2006 ja nr. 3.4-23/ 112 13. märts 2007
Kestvus 01.01.06 – 31.12.07

8. PROJEKTI TÄITJAD RAHASTAMISPERIOODI VÄLTEL (üksnes teema rahastamise raames tasustatud töötajad)

A. Projekti põhitäitjad (sh projekti juht):

Ees- ja perekonnanimi	Teaduskraad	Ülesanded projekti täitmisel	Koormus	Personalikulu
1. Kalle Kask	Veterinaarmeditsiini doktor	Projekti juht	0	0
2. Piret Kalmus	Veterinaarmeditsiini magister	Põhitäitja	0	0
3. Julia Jeremejeva	Doktorant	Doktorant (põhitäitja)	0	0
Kokku				0

B. Projektiga seotud abitöötajad:

1. Niina Sidorova	Vanemlaborant	Vereproovide analüüsimine		3500
2. Anneli Kask	Loomaarst	Emakabiopsiate kogumise assisteerimine, ultraheli		20500

		teostamise assisteerimine		
3. Viia Väkräm	Laudavanem	Piimaproovide kogumine		4500
4. Ilmar Surva	Loomaarst	Vereproovide kogumine, igapäevane loomade kliiniline läbivaatus		12500
5. Margit Künnapas	Loomaarst	Vereproovide kogumine katseloomadelt		10000
6. Valentina Gusselnikova	Laborant	Emakabiotoomide steriliseerimine ja tööks ettevalmistamine		1500
7. Epp Klaassen	Laborant	Mikrobioloogiliste uuringute teostamine		3500
Kokku				56000

9. PROJEKTI KULUD RAHASTAMISPERIOODIL 320000 krooni						
	Kokku	Kulude jagunemine aastate kaupa				
		2004	2005	2006	2007	2008
Töötasud	63927			34600	29327	
Sotsiaalmaks	18570			11418	7152	
Töötuskindlustusmaks	272			106	166	
Asutuse üldkululõiv (max 20%)	64000			32000	32000	
Ostetud teenused	2243			2234	0	
Lähetuskulud	39186			19107	20079	
Muu erivarustus ja -materjal	13845			13845	0	
Masinad, seadmed	3500			0	3500	
Muud kulud	114457			46690	67767	
Kokku	320000			160000	160000	

Kõiki kulusid põhjendada lisas

Lisa 1. Projektkulude tabeli juurde:

Aruandele on lisatud Ülikooli raamatupidamise poolt väljastatud tulude-kulude koondaruanne: artiklite kokkuvõtteid, kus on detailselt näidatud raha liikumine aruandeaastate kestel. Suuremad kuluallikad on põhjendatud allpool.

Töötasud:

Projekti põhitäitjad omavad põhitöökohta, ja seoses sellega töötasude ja lisatasude maksmist neile aruandeaastate jooksul ei toimunud. Töötasude summad maksti välja ajutiste töölepingutega abipersonalile laudas ja laborantidele kes teostasid proovide analüüse ja aitasid proovide kogumise riistastiku ettevalmistamisel.

Lähetuskulud:

Aruandeaastate kestel on käidud välislähetuses 5 korda. Kõik lähetused teostas projekti juht ja 4 korral oli sihtkohaks Rootsi Põllumajandusteaduste Ülikooli Veterinaarmeditsiini teaduskond ja ühel korral Valgevene Vabariik Minsk. Lähetuste käigus Uppsalasse peeti läbirääkimisi mõningate proovide analüüsi võimaluste suhtes, esineti seminariga, kus tutvustati käesoleva projekti eksperimentaalosa ja katseplaani ning esialgseid tulemusi, samuti teostati akuutse faasi proteiinidega seotud uuringud. Lähetuste ajal kasutati ka võimalust töötada kohapealses Ülikooli raamatukogus (uuema erialakirjaduse kättesaadavus). Lähetus Valgevene Vabariiki toimus Rootsi Kunigriigi Teaduste Akadeemia poolt organiseeritud teaduskoostöö võrgustiku raames

(programmi on haaratud Balti Riigid, Sankt Peterburg ja Valgevene Vabariik). Selle programmi raames oli organiseeritud minisümposium Minskis, kus esineti lühiettekandega.

Muud kulud:

Osutusid aruandeaastate vältel suuremaks algselt planeeritustest. Seotud on see eelkõige transpordikulude suurenemisega. Laudad kus katsed teostati asusid väljaspool Tartu maakonda (Järvamaa, Jõgevamaa). Kuna eksperimentaalosa täitmise ajal tuli farme külastada vähemalt 3 korda nädalas on see suurenenud autokütuse kulude põhjuseks. Rolli on mänginud ka kütusehindade pidev tõus. Instituudile kuuluv ja töörühma käsutuses olev sõiduk mida kasutati katselautades käimiseks on amortiseerunud ja selle ülalpidamis- ja käigushoidmise kulud on suurenenud aastast aastasse (kokku transpordikulud (hooldus ja kütus) 55800 EEK). Kulud masinatele seadmetele, mis projekti täitmise käigus soetati jäid raamatupidamiskannetes väikevahendite alla (kogumaksumus 7000 EEK (sülearvuti) ja seetõttu kajastuvad ka need muude kulude all, mis kokkuvõttes näitab selle kuluartikli olulist suurenemist teiste arvelt. Sama kehtib ka ostetud teenuste kohta (teadusartikli korrektuur teenustasuna 4100 EEK), mis raamatupidamiskannetes kajastuvad samuti muude kulude all. Projekti täitmise käigus on hangitud ka uuemat õppe- ja teaduskirjandust 9571 EEK ulatuses, mis jääb VL teraapia osakonna käsutusse. Kassakulude aruandes kajastub see summa kantseleikulude all.

Ülejäänud finantsvahendid on kasutatud töö otseseks täitmiseks (mikrobioloogia söötmed, vereklaasid, vaakumkatsutid koos nõeltega, ravimid, analüüsi rekatiivid, analüüsides teostamine jne.) Küllalt suur kulu oli seotud ka akuutse faasi proteiinide määramisega (analüüsikomplekti maksumus ca 10 500 EEK).

10. PROJEKTI ARUANNE (tehtud tööd, saadud uued teadmised ja tulemused jne):

Uurimuse põhieesmärgiks seati:

1. Eesti kõrgetoodangulistes lüpsikarjades esinevate poegimisjärgsete emakainfektsioonide tõrjeks sobiva ja efektiivselt rakendatava raviskeemi väljatöötamine. Kasutatud raviskeemide põhjalik kliiniline hindamine kasutades ultraheliuuringuid ja taastiinestumise analüüsi.

Projekt oli mõeldud kaheaastasena ja suures osas oli tegemist niinimetatud pilootuuringutega. Jätkuprojekti raames, mis on taotletud aastateks 2008 – 2010 teostatakse lisauuringud ja lõpetatakse täielikult veel eelmise projekti raames kogutud andmete lõppanalüüs. Eksperimentaalosa ja andmete kogumine on praeguseks hetkeks lõpetatud kahes lüpsikarjas (OÜ Estonia, Kaasiku farm (lõaspidamine) ja Torma POÜ farm (vabapidamislaud).

Uuringud teostati järgnevaid meetodikaid kasutades:

1. Katseloomad ja nendest valimite moodustamine:

Lõaspidamislaudas moodustati 3 katserühma, igas rühmas 7 korduvalt poeginud looma: a) rühm keda raviti konkreetse karjas kasutuseloleva raviskeemi järgi; b) rühm kellel kasutati testitavat meetodit (antibiootikum + prostaglandiin $F_{2\alpha}$; c) kontrollrühm (kellel ravi ei teostatud)

Vabapidamislaudas moodustati samuti 3 katserühma, loomade koguarvuga 40 (kõik lehmad korduvalt poeginud): a) rühm keda raviti kombinatsioonis antibiootikum + prostaglandiin $F_{2\alpha}$ (loomade arv 15) b) rühm keda raviti kombinatsioonis antibiootikum + NSAID (loomade arv 15) c) kontrollrühm (kellel ravi ei teostatud) loomade arv 10.

Kuna teostatud uuringute läbiviimine nõudis sünkroonselt poegivate loomade olemasolu, siis lõaspidamislauda teostatud katses, kus loomade arv oli väiksem pandi kõik katses osalevad lehmad poegima väga lühikese ajavahemiku kestel, kasutades $PGF_{2\alpha}$ (Dinolytic®) manustamist ca 2 nädalat enne loodetavat poegimist. Seda meetodit on edukalt kasutatud varasemates

endometriitide uuringutes (Kask jt. 1999, 2000). Selle tagajärjel tekkis kõikidel katses kasutatavatel lehmadel kas osaline või täielik päramiste peetus ja sellele järgnev endometriit. Vabapidamislaudas kasutatavate loomade valim oli aga liiga suur ja poegimiste esilekutusmine ei olnud seal tänu sellele võimalik ning loomad valiti rühmadesse järgneva skeemi alusel: kõikidest 3 kuu kestel poegivatest loomadest valiti välja endometriidist tabandunud loomad mis jagati katserühmadesse vastavalt verest määratud fibrinogeeni tasemele endometriidi diagnoosimise päeval. Sellise valiku eesmärgiks oli võimalikult sarnase APP tasemega loomade saamine rühmadesse.

2. Ravi teostamine:

Lõaspidamislaut: koheselt pärast infektsiooni kindlakstegemist (3 poegimisjärgne päev) alustati parenteraalse antibakteriaalse ravi kasutamist (Ceftifour) 5 päeva kestel ühes katserühmas (a), millele lisandus alates 8'ndast poegimisjärgsest päevast PGF_{2α} preparaate manustamine (2 manustamist intervalliga 8 tundi). Teise katserühma (a) loomi raviti konkreetses laudas kasutusel oleva raviskeemi järgi: oksütotsiini parenteraalne manustamine 3 päeva kestel ja intrauteriine antibiootikumide manustamine 15'ndal ja 30'ndal poegimisjärgsel päeval. Kolmandas rühmas (c) (kontrollrühm) ravi ei teostatud.

Vabapidamislaut: samuti koheselt pärast infektsiooni kindlakstegemist (3 poegimisjärgne päev)) alustati parenteraalse antibakteriaalse ravi kasutamist (Ceftifour) 5 päeva kestel ühes katserühmas (b), millele lisandus alates 8'ndast poegimisjärgsest päevast PGF_{2α} preparaate manustamine (2 manustamist intervalliga 8 tundi). Teise katserühma (a) loomi raviti kombinatsioonis antibiootikum (ceftifour) + NSAID viie päeva kestel. Kolmandas rühmas (c) (kontrollrühm) ravi ei teostatud.

3. Kliinilised uuringud raviefektiivsuse määramiseks:

Lõaspidamislaudas: teostati kõikides katserühmades alates 12'ndast poegimisjärgsest päevast, kuni 50'nda poegimisjärgse päevani 1x nädalas emakainvolutsiooni kiiruse hindamine, mis põhines: a) ultraheliuuringutel (emakasrvede diameetri mõõtmine ja emaka sisalduse hindamine); b) emakast võetud koeproovidest mikrobioloogiliste uuringute teostamisel; c) igapäevaselt emakanõre visuaalne hindamine järgneva skeemi alusel: 5 – vesine, haisev, limasverine; 4 – paks, mädane punakaspruun; 3 – paks, valge mädane; 2 – hägune mädatükikesi sisaldav; 1 – selge lima; 0 – vaginaalnõre puudub. Teostati ka loomade üldseisundi igapäevane hindamine kehatemperatuuri mõõtmise teel, samuti teostati iganädalane kehakonditsiooni hindamine.

Vabapidamislaudas: rakendati sama meetodikat, ainus erinevus oli see, et ultraheliuuringuid ei kasutatud, kuna laudas puudus selleks võimalus (loomade fikseerimis probleem)

4. Proovide kogumine hormoonanalüüsideks ja akuutse faasi proteiinide määramiseks

Poegimisjärgse munasarjafunktsiooni taastumise kindlakstegemiseks kasutati progesterooni määramist piimast 2x nädalas (lõaspidamislaut) ja verest 2x nädalas (vabapidamislaut). Mõlemas laudas teostati ka vereproovide võtmine kogu katseperioodi kestel kaks korda nädalas, millest määrati akuutse faasi proteiinid (Haptoglobiin ja SAA). Nende määramist on lehmadel siiani vähe kasutatud, kuid nende kaudu on võimalik määrata ravi edukust ja lisaks sellele selgitada välja ka nende üldine roll sigimisfunktsioonis.

5. Hormoonanalüüside määramise meetodika

Progesterooni määramiseks piimast kasutati ensüümimmunoloogilist meetodit (Waldmann jt. 1999), verest määramiseks kasutati täiustatud luminessense immunoloogilist meetodit (Duchens jt. 1995). Akuutse faasi proteiinid määrati järgnevaid meetodikaid kasutades: SAA määrati vereplasmast kasutades kommerts ELISA analüüsikitti (Phase SAA kit, Tridelta Ltd.) Haptoglobiini määramiseks kasutati hemoglobiini siduvat analüüsi (Makimuri ja Suzuki 1992), mida modifitseeriti tetrametüülbensidiini substraadina kasutamisega (Alsemgeest jt.1994). Fibrinogeeni määramiseks kasutati pretsipitatsiooni meetodit (Millar jt. 1971).

6. Inna sünkroniseerimine

Kõik katsetes osalevad loomad, kellel ei täheldatud innatunnuseid 70'daks poegimisjärgseks päevaks allutati inna sünkroniseerimisele, kasutades gonadoliberiini ja prostaglandiini kombineeritud meetodit (Co Sync meetod) ja hinnati tiinestuvust katserühmade lõikes.

Hetkel kasutatavad tulemused

Katsetulemuste analüüsid on lõpetatud lõaspidamilaudas teostatud uuringu kohta. Leiti erinevus kehatemperatuurides katserühmade vahel poegimisjärgselt. Madalam oli kehatemperatuur rühmas keda raviti antibiootikumi ja PG kombineeritud raviga. Ei leitud statistilist erinevust katserühmade vahel vaginaalnõre eritumises ja nõre parameetrites. Emaka tugevat bakterioloogilist kontaminatsiooni täheldati kõikides katserühmades esimese 3 poegimisjärgse nädala kestel. Siiski oli bakterite kasv tugevam kontrollrühmas esimese kahe nädala kestel. Kõige sagedasemad isoleeritud bakterid olid *Arcanobacterium. pyogenes*, *Fusobacterium. spp.*, *Bacteroides spp.*, ja *Enterobacter spp.* APP tase oli kõrge kõikides katserühmades esimese kolme poegimisjärgse nädala kestel, pärast seda toimus langus baastasemele. Piimaprogesterooni analüüsidele põhinedes täheldati munasarjafunktsiooni taastumist kõikides katserühmades 70'ndaks poegimisjärgseks päevaks. Küll aga ei täheldatud pooltel loomadest innatunnuseid 70'ndaks poegimisjärgseks päevaks ja need loomad allutati innasünkroniseerimisele. Kõik sünkroniseeritud loomad osutusid tiineks 45 päeval pärast teostatud seemendusi.

Vabapidamislaudas teostatud uuringu kestvus oli tänu sellele, et valimisse selekteeriti loomad kõikidest kolme kuu jooksul poeginud loomadest, väga pikk. Uuringut alustati 2007 a augustis ja lõpetati käesoleva aasta jaanuaris. Tulemuste lõplik analüüs on hetkel teostamisel ja valmib käesoleva aasta maikuuks. Teostatud katsete põhjal on planeeritud avaldada vähemalt kaks teadusartiklit. Esimese artikli kirjutamine on praegusel momendil käimas ja see loodetakse valmis saada käesoleva aasta esimeses pooles. Esialgset uuringu tulemused kantakse ette ka 16'ndal Ülemaailmsel Loomade Reproduktsiooni Kongressil, Ungaris 13 -17 juulini 2008 aastal. Kongressi Teaduskomitee andis positiivse hinnangu meie poolt taotletud stendiettekandele. Uuringuid planeeritakse jätkata jätkuprojekti (2008 – 2010) raames. Kus hinnatakse ka endomeetriumi histoloogilisi muutusi pärast 40'ndat poegimisjärgset päeva. Hüpootees nendeks uuringuteks on järgmine: kuna eelnevad uuringud, näitasid ebanormaalse progesterooniprofiilide suurt esinemist on hüpooteesiks see, et vaatamata ravimeetodite kasutamisele on siiski olemas risk, et emakas esineb madala intensiivsusega nn. krooniline põletik ka veel pärast 40'dat poegimisjärset päeva, mis mõjutab oluliselt taastiinestumist. Seoses sellega pannakse edasistes uuringutes suuremat rõhku ka histoloogiliste muutuste kindlakstegemisele endomeetriumis. Nende uuringute tulemusena selgitatakse välja võimalikud ravivajadused hilises poegimisjärgses järgus ja üritatakse testida selliste ravimeetodite efektiivsust.

11. LÜHIKOKKUVÕTE (*Summary* - kokkuvõte inglise keeles kuni 2 lk)

Acute postpartum endometritis (APE) is a health problem what lead to prolonged calving intervals, reduced conception rates and increases culling. The aim of the study was to test the effect and success of different treatment models in case of APM. Complex post-treatment clinical investigations, uterine microbiology, acute phase proteins (APP) and conception rate results were done. Experimental part, data collection and analyses are finished in one herd. First results are following:

Study was carried out in commercial dairy farm. Multiparous cows (n = 21) were divided into 3 groups, 7 in each. Parturitions were induced in all cows, 2 w before term using PGF_{2α} (1) (Dinolytic[®], BI) for getting retained foetal membranes followed by APM (2). Treatment was started when APE was diagnosed (3rd d PP). Group A served as control group with no treatment. Group B was treated according to strategy commonly used at the farm where experiment was done: i.m. inj. of Carbetocin (Hypophysin[®] LA) during 3 d and i.u. administration of antibiotics

(Metricure®) on the 15th and 30th d PP). In group C i.m. inj. of antibiotics (Ceftifour, Exenell®) during 5 days was done followed by 2 inj. of PGF_{2α} (Dinolytic®, BI) with an interval of 12 h on the 8th d PP. For APP analyses blood samples were collected 2x a w. Evaluation of general health status, body T° and vaginal discharge (existence and character of secretion) was done daily. Uterine biopsies for bacteriological examination were collected once a week during 7 w PP. Animals who had not shown oestrous during 70 days PP were allocated to heat synchronisation and success of synchronisation was evaluated. Ovarian activity was monitored through the analysis of progesterone (P₄) from milk samples taken 2x a week.

Differences in body T° between groups were statistically significant. No statistical difference was found in vaginal discharge between groups. Highest incidence of bacteriological species was found during the first 3 w PP in all groups. Intensity of bacterial growth in uterine biopsies obtained from control group was higher during 2 w PP. The most frequently isolated bacterial species were *A. pyogenes*, *F. spp.*, *Bacteroides spp.*, and *Enterobacter spp.* Levels of APP after parturition were high in all groups and decline to the baseline was seen after 3rd w PP. According to P₄ results resumption of ovarian activity was detected in all animals during 70 d PP. Cows who were allocated to heat synchronisation were confirmed to be pregnant after 45 d. Results from this study indicate that there is no difference in impact of treatment or no treatment of APE.

Second study was started in August 2007 and was finished in January 2008. Study was performed in loose housed herd and animal numbers involved to the experiment was bigger (n=45) due to that it was not possible to induce the parturitions on those animals and animal selection to the experimental groups was done in following way: all animals who were expected to calve during 3 months period were involved to the experiment. After calving only those animals were selected to the experimental groups who suffered with acute postpartum endometritis. Diagnose was made on day 3 postpartum and animals were selected to the experimental groups according to blood fibrinogen results which was detected from blood on the same day as diagnosis was made. Destination was to get to the experimental groups animals with similar APP levels. As such a selection was quite time consuming the experimental part was finished recently. Animals in experimental groups were allocated to following treatment schemes: 1. animals in group A were treated after the diagnosis of APM (day 3 PP) with parenteral antibiotics (ceftifour) during 5 days and was followed by i.m. administration of PGF_{2α} 2X with interval 8 hours; in group B animals were treated after the diagnosis of APM (day 3 PP) with parenteral administration of antibiotics (ceftifour) + NSAID (flunixin) during 5 days; group C was served as control group where no treatment were performed. Sample collection methodology is the same as in previous experiment. Only difference is that no ultrasound based uterine involution studies are not performed, as the experiment is carried on loose housed herd and in such conditions it is not possible. Also progesterone analyses will be performed from plasma, not from milk. First results from performed studies showing that despite the used treatment the pregnancy rate later on was not as expected. We applied the prolongation of the project up to year 2010 to continue with investigations. As our previous investigation results have been showing that despite the treatments there is risk that in endometrium still chronic inflammation exist after day 45 postpartum, which will negatively influence new pregnancy establishment, more intention will be put to histological changes in the endometrium during late postpartum period. Based on those investigations need for later postpartum endometritis treatment methods will be clarified. Also efficiency of those methods will be tested.

12. PROJEKTIGA HAAKUVAD TEADUSTEEMAD, GRANDID, DOKTORI- JA MAGISTRITÖÖD, JÄRELDOKTORITE UURIMISTEEMAD, LEPINGUD, PATENDID:

Projektiga on seotud EV haridusministeeriumi sihtfinantseerimise teema „Koduloomade reproduktsiooni füsioloogia, patoloogia ja biotehnoloogia”, milles käesoleva projekti juht on põhitäitjaks

Lisaks seoti projektiga doktorant Julia Jeremejeva kelle doktoritöö teema on ”Poegimisjärgsed

sigimisfunktsiooni häired lüpsilehmadel nende ravimeetodite täiustamine ja terapeutiliste meetmete kontrollmehhanismide rakendamine.” Doktoritöö juhendajaks on prof. K. Kask.

13. KOOSTÖÖ (lepingud, konverentside korraldamine, töötamine välisriikides jne):

14. TEEMA RAAMES ILMUNUD PUBLIKATSIOONID:

Avaldatud publikatsioonid hetkel puuduvad. Ettevalmistamisel on teadusartikkel, mille pealkiri on „Possible treatment strategies of acute postpartum endometritis in Estonian dairy cows.” J. Jeremejeva, T. Orro, K. Kask. Artikkel valmib käesoleva aasta esimese poolaasta jooksul ja artikli sisu kantakse ette 16. Ülemaailmsel Loomade Reproduktiooni Kongressil (16th International Congress on Animal Reproduction) Ungaris Budapestis 13. – 17. juuli 2008. Kokkuvõtte tulemustest avaldatakse ka kongressi kogumikus.

15. Teema juht Kalle Kask:	Allkiri:	Kuupäev: 28.02.08
Tellijä esindaja kinnitus aruande õigsuse kohta VL direktor Toomas Tiirats:	Allkiri:	Kuupäev: 28.02.08

Täidab põllumajandusteaduste nõukogu

Nõukogu esimees:	Allkiri:	Kuupäev:
-------------------------	-----------------	-----------------

Põllumajandusteaduste nõukogu hinnang tehtud tööle:

⁵ Projekti lõpparuande täitmise juhend on kättesaadav Põllumajandusministeeriumi koduleheküljel <http://www.agri.ee/>