

Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitāte
Latvia University of Life Sciences and Technologies
Veterinārmedicīnas fakultāte
Faculty of Veterinary Medicine



Ivars Lūsis

**SOMATISKO ŠŪNU SKAITA DINAMIKAS KOMPLEKSĀ
IZVĒRTĒŠANA MASTĪTA DIAGNOSTIKĀ GOVJU
ROBOTIZĒTĀ SLAUKŠANĀ UN TRANSFERENCEI
DERĪGU EMBRIJU IEGUVĒ**

***COMPLEX ASSESSMENT OF THE SOMATIC CELL
COUNT DYNAMICS IN MASTITIS DIAGNOSIS IN COWS'
ROBOTIC MILKING AND IN THE PRODUCTION OF
TRANSFERABLE EMBRYOS***

Promocijas darba KOPSAVILKUMS

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

SUMMARY
of the Doctoral thesis for the Doctoral degree of Science (*Ph.D.*)

Jelgava 2024

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitātes (LBTU) Veterinārmedicīnas fakultātes Klīniskajā institūtā; trijos Dobeles, Valmieras un Saldus novada slaucamo.govju ganāmpulkos ar automātisko slaukšanas sistēmu (AMS) jeb.govju slaukšanas robotiem; Aizkraukles, Dobeles, Dienvidkurzemes, Jēkabpils, Madonas, Ogres, Talsu, Tukuma, Saldus, Siguldas, Valmieras, Ventspils novados 15 saimniecībās ar ģenētiskā resursa džīvniekiem transferenci derīgu embriju iegūšanai; Pārtikas drošības, džīvnieku veselības un vides zinātniskajā institūtā “BIOR”; SIA “Centrālā laboratorija”; SIA “Piensaimnieku laboratorija”.

Promocijas darba zinātniskā vadītāja:

LBTU profesore *emeritus*, vadošā pētniece, *Dr. med. vet. Vita Antāne*

Oficiālie recenzenti:

Dr. med. vet. Aija Ilgaža, LBTU Prekļīniskā institūta direktore, profesore, vadošā pētniece

Dr. med. Modra Murovska, Rīgas Stradiņa universitātes Mikrobioloģijas un virusoloģijas institūta vadošā pētniece, asociētā profesore, Latvijas Zinātņu akadēmijas īstenā locekle

Dr. agr. Diāna Ruska, LBTU Dzīvnieku zinātņu institūta direktore, asociētā profesore, vadošā pētniece

Promocijas darbs izstrādāts ar sekojošu projektu finansiālu atbalstu: Latvijas Zinātnes padomes grants “Inovatīvu pasākumu izstrāde produktīvo džīvnieku slimību profilaksei, ārstēšanai un produktivitātes kāpināšanai”. LZP tēmas Nr. 09.1528 (09.1447), apakštēma “Pētījumi par.govju tesmeņa veselību un piena kvalitāti pielietojot slaukšanas robotu tehnoloģiju” (2009 - 2012); Eiropas Reģionālās attīstības fonda projekts BioReproLV “Govju ģenētisko resursu saglabāšana Latvijā pielietojot embriju transferenci un ar to saistītās biotehnoloģijas”. ERAF projekts Nr. 1.1.1.1/16/A/025 (2017 - 2020), (RF17); Eiropas Sociālā fonda projekts “LLU pāreja uz jauno doktorantūras finansēšanas modeli”. ESF projekts Nr. 8.2.2.0/20/I/001 (2021-2023), (ES32).

Promocijas darba aizstāvēšana notiks LBTU Veterinārmedicīnas zinātnes Promocijas padomes atklātā sēdē 2024. gada 28. martā Veterinārmedicīnas fakultātē (Kr.Helmaņa iela 8, Jelgava) A300 auditorijā plkst.13.00.

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

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

The Doctoral thesis was conducted at the Clinical Institute of the Faculty of Veterinary Medicine at Latvia University of Life Sciences and Technologies (LBTU). The animals were studied and samples for the development of the thesis were obtained from three dairy farms with robotic milking in three regions of Latvia – Dobele, Valmiera, and Saldus. The genetic resource cows for embryo acquisition were located at 15 farms in 12 regions of Latvia - Aizkraukle, Dobele, Dienvidkurzeme, Jēkabpils, Madona, Ogre, Talsi, Tukums, Saldus, Sigulda, Valmiera, and Ventspils. Hormone analyses were performed at the Institute of Food Safety, Animal Health, and Environment ‘BIOR’. Biochemical and hematological analyses of blood were conducted at SIA ‘Centrālā laboratorija’. Milk analysis using laboratory instrumental methods was carried out at SIA ‘Pienainnieku laboratorija’.

Scientific supervisor of the Doctoral thesis – Dr. med. vet. Vita Antāne, Professor *Emeritus*, Lead researcher at the Faculty of Veterinary Medicine, Latvia University of Life Sciences and Technologies.

Official Reviewers:

Dr. med. vet. Aija Ilgaža, Professor of the The Faculty of Veterinary Medicine at Latvia University of Life Sciences and Technologies, Lead Researcher, and Director of The Preclinical Institute.

Dr. med. Modra Murovska, MD, *Ph. D.*, Lead Researcher of The Institute of Microbiology and Virology at Rīgas Stradiņš University, Associate Professor, Full Member of The Latvian Academy of Sciences.

Dr. agr. Diāna Ruska, Associate Professor of The Faculty of Agriculture and Food Technology, Lead Researcher, and Director of The Institute of Animal Sciences.

The Doctoral thesis was developed with the financial support of the Latvian Scientific Council grant 09.1528 (09.1447) (2009 - 2012); ERAF project 1.1.1.1/16/A/025 (2017 - 2020); ESF project 8.2.2.0/20/I/001 (2021-2023).

The defense of the Doctoral thesis will be held at the open meeting of the LBTU Doctoral Council for Veterinary Medicine at 13.00 on March 28, 2024, at the Faculty of Veterinary Medicine, 8 Kr.Helmana Street, Jelgava, auditorium No A300.

The Doctoral thesis is available at the Fundamental Library of Latvia University of Life Sciences and Technologies, 2 Liela Street, Jelgava and on the website <http://lbtufb.lbtu.lv>

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

SATURS/ CONTENT

IEVADS	6
MATERIĀLS UN METODES	13
Materiāla raksturojums	13
Pētījuma pirmais bloks, B1	13
Pētījuma otrs bloks, B2	17
Pētījuma trešais bloks, B3	17
Pētījumā izmantoto metožu apraksts	19
Tesmeņa ceturkšņu piena paraugu iegūšana (B1)	19
Mastīta ierosinātāju noteikšana (B1)	19
Tesmeņa ceturkšņu piena sastāva noteikšana (B1)	21
Piena pārraudzības analīžu dati (B1, B2, B3)	22
Slaukšanas robota sensoru reģistrēto datu iegūšana no ganāmpulka pārvaldības sistēmas (B1; B2)	22
Govs vispārējā un speciālā izmeklēšana (B3)	23
Asiņu bioķīmisko, hematoloģisko un hormonu rādītāju noteikšana (B3)	23
Multiplās ovulācijas inducēšana, embriju ieguve un novērtēšana (B3)	24
Govs somatisko šūnu skaita individuālās dinamikas tipa noteikšana (B1)	25
Datu statistiskā apstrāde	27
Pētījuma gaitas apraksts	28
PĒTĪJUMA REZULTĀTI UN DISKUSIJA	31
Piena SSS atkarībā no ierosinātāja klātbūtnes un MDi	31
Tiešsaistes šūnu skaitītāja OCC pielietošanas efektivitāte	36
Mastīta noteikšanas indeksa MDi efektivitāte	41
MDi robežvērtība nekvalitatīva piena novadīšanai	43
SSS sensora MQC-C2 efektivitāte	43
Transferencei derīgu embriju ieguve atkarībā no donorgovju piena SSS	47
SECINĀJUMI	50
IETEIKUMI PRAKSEI	51
INTRODUCTION	52
MATERIAL AND METHODOLOGY	56
Characterization of materials	56
The first study block, B1	56
The second study block, B2	58
The third study block, B3	59
Description of the methods used in the study	60
Collection of milk samples from the cows` udder quarters (B1)	60
Testing of udder pathogens in milk (B1)	60
Determination of the cow udder foremilk composition (B1)	62
Milk recording data (B1, B2, B3)	62

Acquisition of data from milking robot sensors via the herd management system (B1; B2)	62
General clinical and gynecological examination of donors (B3)	63
Biochemical, hematological, and hormone parameter testing in the blood of donors (B3)	63
Multiple ovulation treatment, embryo collection, and evaluation (B3)	64
Determination of each cow's individual type of SCC dynamics (B1).....	65
Statistical data processing	66
Description of the progress of the study	67
RESEARCH RESULTS AND DISCUSSION	68
Milk SCC depending on the presence of the mastitis pathogens and MDi	68
Online cell counter OCC effectiveness.....	70
Mastitis detection index MDi effectiveness.....	72
Viscosity principle-based SCC sensor's effectiveness	73
Acquisition of transferable embryos depending on donor cow's milk SCC	75
CONCLUSIONS	76
PRACTICAL RECOMMENDATIONS	76

IEVADS

Piena somatisko šūnu skaits (SŠS) ir nozīmīgs govju veselības un izslauktā piena kvalitātes rādītājs, kas tiek izmantots neatkarīgi no slaukšanas sistēmas (Gonzalo, Linage et al., 2006; Kamphuis, Dela Rue et al., 2013; Pyörälä, 2003; Schukken, Wilson et al., 2003). Automatizējot piena ražošanas tehnoloģiskos risinājumus, piemēram, pārejot uz robotizētu slaukšanu, SŠS vērtēšana, līdzīgi arī citu veselības un aktivitātes parametru reģistrēšana, iegūst lielāku nozīmi.

Ir izstrādātas dažādas tiešsaistes sensoru sistēmas, lai pārbaudītu atsevišķu govju piena vai atsevišķu tesmeņu ceturkšņu piena atbilstību vēlamajiem kvalitātes kritērijiem (Kawasaki, Kawamura et al., 2008; Meilina, Kuroki et al., 2009). Piena sensori slaukšanas robotā ir paredzēti, lai katrā slaukšanas reizē nosacītu aizstātu piena vizuālo pārbaudi, kas ir svarīgs slaučēja darba uzdevums, lai savlaicīgi konstatētu piena krāsas un konsistences izmaiņas, kas parādās kliniskā mastīta vai tesmeņa traumas gadījumos. Sensoru mēriņumu dati tiek apstrādāti un no tiem ganāmpulka pārvaldības sistēmā aprēķina mastīta noteikšanas indeksu MDi, kas uzrāda govis ar tesmeņa veselības vai piena sastāva izmaiņu problēmu. MDi var izmantot kā šķirošanas kritēriju neatbilstošas kvalitātes piena automātiskai novirzīšanai no koppiena plūsmas uzreiz slaukšanas laikā (Hovinen, Aisla et al., 2006; Hovinen & Pyörälä, 2011). Trauksmes ziņojums atzīmē, ka konkrētai govij būtu jāpievērš vairāk uzmanības, tā jāpārbauda ar klasiskām diagnostikas metodēm – kliniskā izmeklēšana, citoloģiskā un bakterioloģiskā izpētē, lai izlemtu, vai ir nepieciešams uzsākt govs ārstēšanu.

Šobrīd daudziem automātiskās slaukšanas sistēmas (AMS) modeļiem ir iespēja tikt aprīkoti ar somatisko šūnu skaitīšanas sistēmu, kas piedāvā jaunas iespējas mastīta diagnostikā. Tādēļ ir vajadzīga informācija par jauno metožu mērišanas precizitāti, kā arī praktiskās piemērošanas principiem un iespējamiem ieguvumiem piena kvalitātes un dzīvnieku veselības uzlabošanā. Noskaidrojot slaukšanas robotā iebūvētā tiešsaistes šūnu skaitītāja (OCC, DeLaval) un netiešā šūnu skaitītāja (MQC-C2, Lely) efektivitāti, būtu iespējams precīzi atklāt problemātiskos dzīvniekus turpmākai ganāmpulka veselības pārvaldībai un veterinārajām darbībām.

Tesmeņa iekaisuma patoģēnēzē izšķirošs faktors ir bakteriāla ierosinātāja klātbūtne. Arī mastīta diagnostikā ierosinātāja noteikšana, respektīvi, aseptiski iegūta piena parauga laboratoriskā izmeklēšana uz mastīta ierosinātāju klātbūtni pienā, ir pamats profilaksei, terapijai un prognozei. Diemžēl slaukšanas robota dizains nav tā veidots, lai varētu droši un bez speciālas govs fiksēšanas iegūt aseptiskus ceturkšņu piena paraugus nosūtīšanai uz bakterioloģisku izmeklēšanu laboratorijā (Penry, 2018). Gofs slaukšana notiek vairākas reizes dienā, un robotizētā slaukšanā tas notiek dažādos laikos visas diennakts garumā. Tāpēc tesmeņa ceturkšņu intramammārās infekcijas (IMI) statusa noteikšanai ir

nepieciešami atšķirīgi principi. No veterinārā skatpunktā, jebkuru tesmeņa veselības sensoru un to signālu apstrādes rezultātā iegūtu tesmeņa trauksmes zinojumu loma ir nodrošināt objektīvu pamatojumu tālākai rīcībai. Gan augsts SŠS, gan piena elektrovadītspējas paaugstināšanās, atkarībā no rādītāju izmaiņu apjoma, turpmākai rīcībai nosaka divas alternatīvas – nekavējoties uzsākt govs pilnu klinisko pārbaudi, tai skaitā, ceturķņu piena paraugu iegūšanu bakterioloģiskai testēšanai laboratorijā, vai arī novērot govs stāvokli un sekot rādītāju izmaiņām līdz atkārtotai trauksmei nākamajā slaukšanas reizē. Ja trauksmes atkārtojums nākamajā slaukšanas reizē neseko, tad uzskata, ka pastiprināta uzmanība dzīvniekam vairs nav nepieciešama. Sakarā ar to, ka SŠS var svārstīties un pēc tā paaugstināšanās atgriezties iepriekšējā līmenī laikā līdz nākamai slaukšanas reizei, tūlītēja skartā ceturķņa piena parauga bakterioloģiskā izmeklēšanas nepieciešamība nav pamatojama ar viena mērijuma rezultātiem (De Vliegher, Ohnstad et al., 2018). Zinātniskos pētījumos pat iesaka veikt atkārtotu paraugu noņemšanu un pieturēties pie, t.s., “zelta standarta”, ar ko apstiprina konkrētu IMI kādā tesmeņa ceturksni. Iekārtotu trīs piena paraugus no katras ceturķņa un testējot tos uz mastīta ierosinātāja klātbūtni, par pierādītu IMI var atzīt tikai tādu patogēnu, kas paraugu izmeklēšanā konstatēts vismaz divās no trijām reizēm (Leitner, Blum et al., 2020). Tomēr, trīs paraugu izmeklēšana salīdzinot ar vienu vai diviem paraugiem, daudzās situācijās var būt dārga, apgrūtinoša vai pat neiespējama (Dohoo, Andersen et al., 2011).

Studējot literatūru par SŠS govju pienā, var pamanīt, ka SŠS paaugstināšanās cēloņi var būt saistīti ne tikai ar patoloģisku procesu norisi tesmenī, bet arī dzimumsistēmā, imūnsistēmā u.c. Arī ietekme pretējā virzienā, no tesmeņa uz dzimumsistēmu, saista zinātnieku interesī, piemēram, IMI un ar to saistītie toksīni pasliktina ovocītu nobriešanu (Asaf, Leitner et al., 2014), ovulāciju, apaugļošanos un embriju attīstību (Soto, Natzke et al., 2003), *corpus luteum* pieaugšanu un izmaina dzimumhormonu koncentrācijas (Lavon, Ezra et al., 2011). Lai gan nav šaubu, ka subklīnisks mastīts ilgtermiņā ietekmē auglību, tā negatīvā ietekme uz dzīvnieka reprodukciju ir nepietiek;oši izpētīta un maz dokumentēta (Wolfenson, Roth et al., 2019). Pētījumi liecina par IMI ilgtermiņa traucējošo ietekmi uz folikulu un olšunu funkcionālo darbību (Furman, Leitner et al., 2014; Lavon, Leitner et al., 2011). Tāpēc bija noderīgi pētījuma tēmā par SŠS kompleksu izvērtēšanu iekļaut arī darba uzdevumu par SŠS saistībā ar govs atražošanas funkcijām, lai noskaidrotu embriju donorgovju veselības rādītāju, to skaitā arī SŠS, ietekmi uz embriju kvantitatīvi un kvalitatīvi. Jautājums par SŠS izvērtēšanu govīm pirms izvēles par embriju donoriem ir maz pētīts, bet aktuāls govju šķirņu ģenētisko resursu saglabāšanas programmās Latvijā, kur šķirnes prasībām atbilstošo govju skaits ir ierobežots.

Aizstāvamās tēzes. (1) Piena kvalitātes noteikšanas sensori, kas uzstādīti slaukšanas robotos un ir paredzēti govs tesmeņa veselības izmaiņu konstatēšanai,

bieži parāda savstarpēji pretrunīgus vērtējumus un tādēļ rezultātu interpretācijai ir nepieciešami uzlabojumi; (2) Mastīta ierosinātāju noteikšana tesmeņa ceturķšņu sākuma slaukuma pienā vienlaicīgi ar SŠS mērīšanu precīzi nodrošina subklīniska mastīta diagnostiku un ir atskaites robeža piena elektrovadāmības sensoru pielietojuma efektivitātes vērtēšanā; (3) Atkārtoti SŠS mērījumi katrā govs slaukšanas reizē, precīzāk raksturo piena dziedzerī iekļuvuša mastīta ierosinātāja klātbūtnes pastāvīgumu; (4) Mastīta diagnostikas un piena kvalitātes vērtēšanas parametrs SŠS var tikt pielietots kā govs auglības potenciāla indikators un embriju donorgovju atlases kritērijs.

Hipotēze. Somatisko šūnu skaits ir ne vien mastīta diagnostikas un piena kvalitātes vērtēšanas parametrs, bet arī slaucamo govju tesmeņa aizsardzības un govs reprodukcijas spēju netiešs indikators, kura dinamikas izvērtēšanas aktualitāte pieaug, automatizējot piena ražošanas tehnoloģiskos risinājumus.

Promocijas darba mērķis: izvērtēt slaukšanas robotu sensoru reģistrēto govs tesmeņa veselības rādītāju efektivitāti somatisko šūnu skaita (SŠS) individuālās dinamikas raksturošanai, lai atklātu subklīnisku mastītu, kā arī izpētīt SŠS rādītāju eventuālo nozīmi embriju donoru atlasē.

Promocijas darba uzdevumi:

1. izpētīt majorpatogēno un minorpatogēno mastīta ierosinātāju epizodiskas un nepārtrauktas klātbūtnes ietekmi piena dziedzerī uz SŠS paaugstināšanos govs pienā subklīniskas intramammārās infekcijas gadījumos;
2. novērtēt slaukšanas robota tiešsaistes šūnu skaitītāja OCC, kas darbojas pēc fluoroptiskā principa, precizitāti, lai atpazītu ražošanas apstākļos govis ar $S\dot{S}S > 200$ tūkst. šūnas mL^{-1} , un analizēt OCC rezultātu mainību vairākās secīgās govs slaukšanas reizēs;
3. novērtēt govju robotizētās slaukšanas sistēmās pielietotā mastīta noteikšanas indeksa MDi vispārējo efektivitāti, lai atpazītu govis ar $S\dot{S}S > 200$ tūkst. šūnas mL^{-1} un mastīta ierosinātāju klātbūtni pienā, kā arī salīdzināt MDi robežvērtības neatbilstošas kvalitātes piena automātiskai novirzīšanai;
4. novērtēt slaukšanas robotā integrēta SŠS noteikšanas sensora MQC-C2, kas darbojas pēc viskozitātes principa, mērījumu precizitāti un vispārējo diagnostisko sakritību ar laboratorijas instrumentālo metodi, lai atpazītu ražošanas apstākļos govis ar $S\dot{S}S > 200$ tūkst. šūnas mL^{-1} ;
5. izvērtēt *corpus luteum* skaitu pēc multiplās ovulācijas, kopējo iegūto embriju skaitu un transferencei derīgo embriju skaitu atkarībā no SŠS donorgovs pienā, kā arī vērtēt SŠS rādītāja pielietojumu donoru atlases.

Darba zinātniskā novitāte:

1. Izstrādāts un pārbaudīts somatisko šūnu skaita individuālās dinamikas iedalījums četros tipos, kas atspoguļo mastīta ierosinātāju iespējamo klātbūtni govs pienā.
2. Pētījuma rezultātā noskaidrota vairāku slaukšanas robotos pielietoto piena kvalitātes sensoru spēja atpazīt slaukšanas procesā govis ar paaugstinātu somatisko šūnu skaitu pienā virs 200 tūkst. šūnas mL⁻¹. Izmantojot reālus govju izslaukuma datus modelētas mastīta noteikšanas indeksa MDi ieteicamās robežvērtības kvalitātes prasībām neatbilstoša piena novadišanai.
3. Apstiprināta mastīta noteikšanas indeksa MDi paaugstināšanās uz majorpatogēno ierosinātāju epizodisku klātbūtni pienā un norādīts uz tā nepietiekamu paaugstināšanos majorpatogēno ierosinātāju ilgstošas klātbūtnes gadījumos.
4. Ar multiplās regresijas metodi izvērtēti faktori, tai skaitā, somatisko šūnu skaits govs pienā, kas ietekmē transferencei derīgu embriju ieguvu no Latvijas Zilās, Latvijas Brūnās un Dānijas Sarkānās šķirnes donorgovīm un izstrādātas rekomendācijas efektīvākai embriju donoru atlasei un procesa organizēšanai.

Pētījuma rezultātu aprobācija/ *Approbation of the research results*

Zinojumi starptautiskās zinātniskās konferencēs/ *Reports at international scientific conferences:*

1. **Lūsis I.**, Antāne V., Šematoviča I., Waldmann A., Ponomarjova O., |Ringa-Ošleja G., Skuja S. Mangale M., Kanska I., Līdaks M. Influencing factors on the multiple ovulation and embryo acquisition in local cow breeds. *First European Symposium on Animal Reproduction*: Nante, Francija, 21.-23. septembris, 2023 / Nantes Convention Center. Stenda referāts/ poster.
2. **Lūsis I.**, Antāne V., Laurs A. Viscosity method in robotic milking system for detection of somatic cell count in milk. *18th International scientific conference “Engineering for Rural Development”*: Jelgava, 2019. gada 22.-24. maijs / Latvijas Lauksaimniecības universitāte. Tehniskā fakultāte. Jelgava. Prezentēšana mutiski/ oral presentation.
3. **Lūsis I.**, Antāne V., Laurs A. Effectiveness of mastitis detection index for cow monitoring and abnormal milk detection in milking robots. *16th International scientific conference “Engineering for Rural Development”*: Jelgava, 2017. gada 24.-26. maijs / Latvijas Lauksaimniecības universitāte. Tehniskā fakultāte. Latvijas

- Lauksaimniecības un meža zinātņu akadēmija. Jelgava. Prezentēšana mutiski/ *oral presentation*.
4. **Lūsis I.**, Antāne V., Laurs A. Detection of possible mastitic cows by using milking system with on-line somatic cell counter. *Konference "Veterinārmadicīnas zinātnes un prakses aktualitātes - 2014"*: Jelgava, 2014.gada 27.-28. novembris / Latvijas Lauksaimniecības universitāte. Veterinārmadicīnas fakultāte. Jelgava. Stenda referāts/ *poster*.
 5. **Lūsis I.**, Antāne V., Laurs A. Significance and application of the online cell counter in the milking robot. *Lactation research in mammals and humans: the mammary gland in health and disease with particular focus on the mammary gland close post partum including indicators of inflammation and pathogens of the mammary gland*: Upsala, Zviedrija, 2010. gada 7.-8. decembris / Uppsala University, Uppsala. Stenda referāts/ *poster*.
 6. **Lūsis I.**, Antāne V., Laurs A. Effectiveness of somatic cell count determination in the milking robots. *9th International scientific conference "Engineering for Rural Development"*: Jelgava, 2010. gada 27.-28. maijs / Latvijas Lauksaimniecības universitāte. Tehniskā fakultāte. Jelgava. Prezentēšana mutiski/ *oral presentgation*.
 7. **Lūsis I.**, Antāne V., Laurs A. Subclinical intramammary infections of cows on the dairy farm with milking robot. *14th International conference on production diseases in farm animals (ICPD)*: Gente, Beļģija, 2010. gada 20.-24. jūnijs / Ghent University, Ghent, 2010. Stenda referāts/ *poster*.

Zinātniskās publikācijas/ Scientific publications

Zinātniskās publikācijas **žurnālos/** Scientific publications in **journals** (indeksētas/ indexed by Scopus or Web of Science):

1. **Lusis, I.**, Antane, V., Waldmann, A. (2023). Indirect sensing of subclinical intramammary infections in dairy herds with a milking robot. *Sensors*, Vol.23(22), article number 9036. <https://doi.org/10.3390/s23229036>
2. **Lusis, I.**, Antane, V., Waldmann, A., Sematovica, I., Ponomarjova, O., Ringa-Osleja, G., Skuja, S., Mangale, M., Kanska, I., & Lidaks, M. (2021). Factors influencing embryo quantity and quality in donor cows from Latvian Blue, Latvian Brown, and Danish Red breeds at risk in Latvia. *Livestock Science*, 254 (October), 104739. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2021.104739>

3. Antane, V., **Lusis¹, I.**, Sematovica, I., Waldmann, A., Kanska, I., Mangale, M., Ringa-Osleja, G., & Lidaks, M. (2021). Factors influencing multiple ovulation in dairy cows from Latvian brown, Latvian blue, and Danish red breeds at risk in Latvia. *Livestock Science*, 243(June), 104379. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104379>

Publikācijas un tēzes **konferenču rakstu krājumos/ Publications and theses in conference proceedings** (indeksētas/ indexed by Scopus or Web of Science):

4. **Lusis, I.**, Laurs, A., & Antane, V. (2019). Viscosity method in robotic milking system for detection of somatic cell count in milk. *Engineering for Rural Development*, 4, 324–329. <https://doi.org/10.22616/ERDev2019.18.N095>
5. **Lusis, I.**, Antane, V., & Laurs, A. (2017). Effectiveness of mastitis detection index for cow monitoring and abnormal milk detection in milking robots. *Engineering for Rural Development*, 16, 1383–1387. <https://doi.org/10.22616/ERDev2017.16.N314>
6. **Lusis, I.**, Antane, V., & Laurs, A. (2010). Effectiveness of somatic cell count determination in the milking robots. *Engineering for Rural Development - International Scientific Conference*, 112–116.
7. **Lusis, I.**, Antane, V., Sematovica, I., Waldmann, A., Ponomarjova, O., Ringa-Ošleja, G., Skuja, S., Mangale, M., Kanska, I., & Lidaks, M. (2023) Influencing factors on the multiple ovulation and embryo acquisition in local cow breeds. *Reproduction in Domestic Animals*.- Vol.58(S2), pp. 223-224. <https://doi.org/10.1111/rda.14442>

Publikācijas un tēzes **konferenču ziņojumu izdevumos/ Publications and theses in conference proceedings**:

8. **Lūsis, I.**, Antāne, V., Šematoviča, I., Waldmann, A., Ponomarjova, O., Ringa-Ošleja, G., Skuja, S., Mangale, M., Kanska, I., & Lidaks, M. (2022). Atsevišķu faktoru ietekme uz multiplo ovulāciju un embriju ieguvī LZ, LB un DS šķirnes donorgovīm. In: *Konferences "Veterinārmedicīnas zinātnes un prakses aktualitātes" raksti, Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitāte, Veterinārmedicīnas fakultāte - Jelgava, 2022. - 4.-5.lpp.*

¹ Korespondējošais autors/ Corresponding author

9. **Lusis, I.**, Antane, V., & Laurs, A. (2014). Detection of possible mastitic cows by using milking system with on-line somatic cell counter. In: Dzīvnieki. Veselība. Pārtikas Higiēna: Konferences "Veterinārmedicīnas Zinātnes un Prakses Aktualitātes - 2014" Raksti, Jelgava – LLU Veterinārmedicīnas fakultāte, p.105.
10. **Lusis, I.** (2012). Antimicrobial resistance of the mastitis pathogens in dairy cows. In: *Dzīvnieki. Veselība. Pārtikas higiēna: konferences "Veterinārmedicīnas zinātnes un prakses aktualitātes"* raksti, Jelgava - LLU Veterinārmedicīnas fakultāte, (pp. 88–91).
11. **Lusis, I.**, Antane, V., & Laurs, A. (2010). Significance and application of the online cell counter in the milking robot. In: S. Agenas, G. Hallberg, E. Kylberg, K. Persson Waller, & B. Strom Holst (Eds.), *Lactation research in mammals and humans: The mammary gland in health and disease*, Uppsala (p. 38).
12. **Lusis, I.**, Antane, V., & Laurs, A. (2010). Subclinical intramammary infections of cows on the dairy farm with milking robot. In G. Opsomer (Ed.), *Book of proceedings: 14th International conference on production diseases in farm animals (ICPD)*, (pp. 87–88).
13. **Lusis, I.**, Kocina, I., Antane, V., & Jemeljanovs, L. (2007). Changes in immunological parameters and lactose in cows with increased somatic cell count in milk. In: R. Bage, N. Fedosova, P. K., & M. Stakheeva (Eds.), *Animal farming in transition - the role of animal reproduction: Mastitis symposium*, StPetersburg Veterinary Academy, (p. 18).

Darba apjoms. Promocijas darbs noformēts uz 85 lappusēm ar 19 tabulām un 16 attēliem.

Promocijas darbs izkārtots astoņās nodaļās: ievads, literatūras apskats, materiāls un metodes, pētījuma rezultāti, diskusija, 7 secinājumi, 3 ieteikumi praksei, izmantotās literatūras saraksts (137 literatūras avoti) un darbam pievienoti trīs pielikumi.

MATERIĀLS UN METODES

Materiāla raksturojums

Pētījumā aprakstītās darbības ar slaucamām govīm ir īstenotas promocijas darba uzdevumu izpildei vairākos posmos. Atbilstoši pētījuma norisei un dzīvnieku atlases atšķirībām materiāls ir pakārtots trīs pētījuma blokiem, kas apzīmēti ar B1, B2 un B3.

Pētījuma pirmais bloks, B1

Pētījums veikts divās piena lopkopības saimniecībās Latvijā. **Pirma saimniecība S1** atrodas Vidzemes reģionā, un šajā saimniecībā izmanto DeLaval firmas govju automatizēto slaukšanas sistēmu (VMS, DeLaval, Zviedrija). Robotizētās slaukšanas grupā tiek turētas līdz 60 govīm. Saimniecībā bez slaukšanas robota ir arī slaukšanas zāle, kurā notiek pārējo govju slaukšana. Slaukšanas robota govju grupa ir atvērta, jo grupas sastāvs periodiski tiek atjaunots ar augsta izslaukuma govīm, turpretī laktācijas beigu posmā, samazinoties izslaukumam, govis no robota grupas pārvieto uz citu slaukšanas grupu. Somatisko šūnu skaits mērīšanai slaukšanas robota stacija ir aprīkota ar fluoroptisko tiešsaistes šūnu skaitītāju OCC (*Online Cell Counter*). S1 govis atrodas nepiesietās turēšanas novietnē ar dzelzsbetona režģu grīdu un kūtsmēšlu šķidrās frakcijas uzkrāšanu zem tās. Guļvietas ir veidotas kā dziļie boksi, kuros par pakaišu materiālu ieklātas smiltis un smalcināti salmi. Saimniecībā S1 govis saņem pilnīgi samaisītu barības devu. **Otrā saimniecība S2** atrodas Zemgales reģionā, un šajā saimniecībā tiek lietota automatizētā slaukšanas sistēma (VMS, DeLaval). Govju skaits robotizētās slaukšanas grupā 110...120 govis, ko apkalpo divi slaukšanas roboti. Saimniecībā S2 govis atrodas nepiesietās turēšanas novietnē ar seklajiem guļvietu boksiem, kuros ieklāts gumijas matracis, bet kūts ejās ieklāts gumijas paklājs. Kūts ejās mēslus tīra ar skrēpera tipa transportieri. Saimniecībās S1 un S2 govju tesmeņa sagatavošana slaukšanai notiek automātiskā režīmā, reizē veicot katru pupu atsevišķu tīrīšanu un pirmo piena strūklu noslaukšanu. Pēc slaukšanas stobriņu automātiskas noņemšanas slaukšanas beigās un pirms govs iet ārā no slaukšanas stacijas, smidzināšanas iekārtā pārklāj pupu galus un tesmeņa ventrālo virsmu ar jodu-saturošu dezinfekcijas šķidumu, kas ir paredzēts govju pupu pēcslaukšanas dezinfekcijai (*Prima Plus*, DeLaval, Zviedrija).

Somatisko šūnu skaita rezultāts, ko iegūst ar OCC, tika salīdzināts ar fluorescent-opto-elektronisko laboratorijas instrumentālo metodi. Šim nolūkam **vienā** slaukšanas reizē S1 ganāmpulka govīm, izmantojot slaukšanas robotā esošo piena paraugu iegūšanas iekārtu, no visā govs slaukšanas reizē izslauktā piena 40 mL iepildīja paraugu pudelītē ar cieši noslēdzamu vāku. Paraugu

konservēja, tajā izšķīdinot konservanta BSM II (*Broad Spectrum Microtabs*) tabletī. Paraugus nosūtīja uz izmeklēšanu akreditētā piena laboratorijā, kur somatisko šūnu skaitu mērija ar automātisko piena analizatoru Fossomatic FC (FOSS, Hilleroed, Dānija) (LVS EN ISO 13366-2:2007 aktuālā versija).

Govju SŠS individuālās dinamikas vērtēšana ar OCC veikta S1 ganāmpulka robota grupas govīm (n=31) katrā slaukšanas reizē viena mēneša laikā reģistrējot N=1733 SŠS mērījumus. SŠS individuālās dinamikas vērtēšanas periodā katrai govīj (n=31) divas reizes veica arī tesmeņa ceturķšu piena paraugu bakterioloģisku izmeklēšanu uz mastīta ierosinātāju klātbūtni, kā aprakstīts šajā promocijas darbā.

Lai izvērtētu mastīta noteikšanas indeksa (MDi) vērtību dinamiku, govīm (n=20) trīs nedēļu laikā (S1 ganāmpulkls, 2010. g.) reizi dienā noteiktā stundā tika atzīmēti ganāmpulka pārvaldības sistēmas displejā redzamie aktuālie MDi rādījumi, jo ganāmpulka pārvaldības sistēmā nesaglabāja iepriekš aprēķinātās MDi vērtības. Pārējā informācija par govs izslaukumu, slaukšanas reižu skaitu dienā, piena elektrovadītspēju, iespējamo asiņu klātbūtni pienā iegūta no ganāmpulka pārvaldības sistēmas attiecīgā laika perioda rezerves datu kopijas.

Lai izvērtētu MDi rādītāja pielietojuma efektivitāti augsta SŠS govju atklāšanai, kā arī vērtētu mastīta ierosinātāju klātbūtnes ietekmi uz piena SŠS, tika atlasītas MDi paaugstināšanās **gadījumu (G)** un **kontroles (K)** govju grupas (1. tabula). Govju atlasi veica oktobra mēnesī (S1, 2009. g. oktobris) un papildināja divas reizes (S1, 2010. g. oktobris un S2, 2011. g. oktobris). Katru gadu tika vispirms atlasītas govis, kurām iepriekšējā slaukšanas reizē ganāmpulka pārvaldības sistēmā (“Cow monitoring in VMS”, DeLaval International, Zviedrija) reģistrēts vērtējums $MDi \geq 1.4$. Govis ar $MDi \geq 1.4$ sastādīja tesmeņa veselības trausmes **gadījumu grupu (n=21)**. No visām pārējām slaukšanas robota grupas govīm, tas ir govīm ar $MDi < 1.4$, ar vienkāršas nejaušas atlases metodi izvēlējās pāra kontroles govis, nemot vērā gadījumu grupas dzīvnieka laktāciju skaitu (1.laktācija, 2.laktācija un 3.+ laktācija) un laktācijas fāzi (sākuma (10...100 dienas), vidus (101...200 dienas), beigu (201...305 dienas) un pagarināta laktācija (>305 dienas)). Gadījuma-kontroles pētījuma grupu sastāvs parādīts tabulā (1. tabula). Gadījumu grupā nebija pārstāvētas govis no laktācijas sākuma fāzes tāpēc nebija iespējams izveidot attiecīgu pāri. **Kontroles grupā (n=24)** laktācijas sākuma fāzi reprezentēja 3 govis, kurām $MDi < 1.4$.

1. tabula/ *Table 1. Gadijumu un kontroles grupu sastāvs atkarībā no govs laktāciju skaita un dienu skaita kopš atnešanās/ Case and control groups depending on cows` lactation number and the number of days from calving*

Laktācija/ Parity	Laktācijas fāze ¹ / Lactation phase								Kopā/ Total	
	sākuma/ early		vidus/ middle		beigu/ late		pagarināta/ extended			
	G ²	K ³	G	K	G	K	G	K		
1.laktācija/ 1st	0	2	1	1	3	3	3	4	17	
2.laktācija/ 2nd	0	0	1	1	2	2	2	2	10	
≥ 3. laktācija/ ≥ 3rd	0	1	1	1	5	5	3	2	18	
Govju skaits, kopā / <i>Total cows</i>	0	3	3	3	10	10	8	8	45	

¹ Laktācijas fāze pēc laktācijas dienu skaita: 10-100 sākuma fāze, 101-200 vidus fāze, 201-305 beigu fāze, un pagarināta laktācija >305 dienas/ *Lactation phases by number of days in milk: early phase 10–100, middle phase 101–200, late phase 201–305, and extended lactation > 305 days;*

²G – gadījumu grupa/ *case group cows/*, govis ar MDi ≥ 1.4;

³K – kontroles grupa/ *control group cows/*, govis ar MDi < 1.4.

Gadijumu un kontroles grupas govju ražības rādītāju salīdzinājums ir parādīts tabulā (2. tabula). Kontroles grupas govīm ir mazāks dienu skaits no atnešanās līdz pētījuma uzsākšanai, jo grupā ir iekļautas trīs govis līdz 100. laktācijas dienai. Kontroles grupas govīm ir augstāks izslaukums un zemāks SSS salīdzinājumā ar gadījumu grupas govīm.

Pētījuma 1.bloka izstrāde veikta Latvijas Zinātnes padomes grantu 09.1447 un 09.1528 “Pētījumi par slaucamo govju tesmeņa veselību un piena kvalitāti, pielietojot slaukšanas robotu tehnoloģiju” ietvaros. Veicot darbības ar dzīvniekiem, tika ievērotas tajā laikā spēkā esošās normatīvo aktu prasības un ētikas normas. Uzsākot darbu saimniecībā, bija saņemta fermas īpašnieka (vai fermas vadītāja) mutiska atļauja atlasīt pētījuma govju grupu, saņemt pilnu informāciju par govju datiem no ganāmpulka pārvaldības datorsistēmas, tai skaitā izveidot rezerves datu kopijas, izmantot piena pārraudzības datus, iegūt no govīm slaukšanas laikā ceturkšņu piena paraugus, kā arī publicēt pētījuma rezultātus. Fermas īpašnieks bija informēts par to, ka piena paraugu iegūšana slaukšanas laikā neradīs risku dzīvnieka labturībai un veselībai. Fermas īpašnieks nodrošināja darbinieku, kas pārzina automātiskās slaukšanas sistēmas (AMS) govju plūsmas organizēšanu tā, lai pārējām saimniecības govīm netiku aizkavēta to slaukšana.

2. tabula/ Table 2. Gadījumu un kontroles grupu govju ražības rādītāji, vidējais (SE¹)/ Cows` productivity parameters in case and control groups, mean (SE¹)

Rādītājs/ Parameter	Gadījumu grupa/ Case group, n=21	Kontroles grupa/ Control group, n=24	Visas govis/ All cows, n=45
Laktāciju skaits/ The number of lactations	2.38 (0.28)	2.17 (0.25)	2.27 (0.19)
Laiks no atnešanās līdz pētījuma uzsākšanai, dienas/ Duration from calving to the start of study, days	301 (23)	252 (24)	274 (17)
Izslaukums, kg diena ⁻¹ / Milk yield, kg day ⁻¹	19.0 (2.1)	24.0 (2.1)	22.2 (1.6)
Piena tauki, %/ Milk fat, %	3.08 (0.38)	3.26 (0.31)	3.17 (0.24)
Piena olbaltumvielas, %/ Milk protein, %	3.68 (0.10)	3.66 (0.10)	3.67 (0.07)
Piena lakteoze, %/ Milk lactose, %	4.75 (0.07)	4.77 (0.05)	4.76 (0.04)
Somatisko šūnu skaita vērtējums, log ₂ vienības/ Somatic cell score, log ₂ units	5.06 (0.43)	3.26 (0.37)	4.07 (0.32)

¹SE – standartklūða/ standard error.

Pētījuma laikā, no 2009. gada oktobra līdz 2011. gada oktobrim Dzīvnieku aizsardzības likums (ar labojumiem un papildinājumiem spēkā no 01.01.2000) un Ministru Kabineta noteikumi “Eksperimentos un zinātniskos nolūkos izmantojamo dzīvnieku turēšanas, izmantošanas, tirdzniecības un nogalināšanas kārtība” Nr.450 (izdoti 23.10.2001.: prot. Nr.52-11.), kā arī vēlāk pieņemtie Ministru kabineta noteikumi “Noteikumi par izmēģinājumu dzīvnieku audzētāju, piegādātāju un lietotāju reģistrāciju, kārtība, kādā veicamas darbības ar izmēģinājumu dzīvniekiem, un izmēģinājumu dzīvniekiem nodrošināmās labturības prasības” Nr.1131 (izdoti 21.12.2010.: prot. Nr.74-45.) neparedzēja speciālas atļaujas izņemšanu pētījuma veikšanai, kas nav eksperimentāls pētījums, jo dzīvniekiem nebija plānotas procedūras ārpus saimniecības ražošanas prakses (Latvijas Republikas Ministru Kabinets, 2001, 2010; Latvijas Republikas Saeima, 2000). LBTU iekšējā Dzīvnieku labturības un aizsardzības ētikas padome tika izveidota vēlāk (2015. gada 30. martā; rektores rīkojums nr. 4.3.-13/29).

Pētījuma otrs bloks, B2

Lai novērtētu slaukšanas robota SŠS sensora, kas darbojas pēc viskozitātes principa, mērījumu precizitāti praktiskos apstākļos, pētījums veikts Kurzemes reģiona saimniecībā S3 ar 120 slaucamām govīm, kurā govju slaukšanai izmanto divas automatizētās slaukšanas darba stacijas (Astronaut A4, Lely, Niderlande), kas aprīkotas ar MQC-C2 sensoriem SŠS noteikšanai govs tesmeņa koppienā, respektīvi visā govij izslauktā piena daudzumā. No slaukšanas robota vadības sistēmas tika iegūti slaucamo govju ($n=120$) SŠS dati, kas mērīti ar viskozitātes metodi visā no govs izslauktā pienā, ko ieguva vienā slaukšanas reizē. Šie dati katrai govij iegūti par astoņām slaukšanas reizēm pēc kārtas. Trešajā slaukšanas reizē (testa reizē), izmantojot slaukšanas robotā esošo piena paraugu iegūšanas iekārtu, no visā govs slaukšanas reizē izslauktā piena 40 mL iepildīja paraugu pudelītē ar cieši noslēdzamu vāku. Paraugu konservēja, tajā izšķīdinot konservanta BSM II tabletē. Paraugus nosūtīja uz izmeklēšanu akreditētā piena laboratorijā, kur somatisko šūnu skaitu mērija ar laboratorijas instrumentālo metodi iekārtā Fossomatic FC (FOSS, Hilleroed, Dānija). Pārējām 9 govīm pēc atnešanās bija pagājušas ne vairāk kā 7 dienas, un to SŠS salīdzinājumā neiekļāva.

Pētījuma 2. blokā nekādas procedūras dzīvniekiem netika veiktas un to ikdienas dzīves rutīna netika mainīta. Atbilstoši tajā laikā spēkā esošiem Ministru Kabineta noteikumiem “Noteikumi par zinātniskiem mērķiem izmantojamo dzīvnieku aizsardzību” Nr. 52 (22.01.2013. (prot. Nr.5-25.) šādos gadījumos pētījuma uzsākšanai nav nepieciešama Pārtikas un veterinārā dienesta atļauja un atzinums no Dzīvnieku labturības un aizsardzības ētikas padomes, jo šie noteikumi neattiecas uz praktiskām darbībām, kas neizraisa sāpes, ciešanas, diskomfortu vai ilgstošu kaitējumu, kurš līdzvērtīgs vismaz adatas ievadīšanai atbilstoši labai veterinārmedicīniskai praksei (Ministru Kabineta noteikumi Nr.52, 5.6. punkts) (Latvijas Republikas Ministru Kabinets, 2013).

Pētījuma trešais bloks, B3

Pētījums veikts 16 slaucamo govju saimniecībās Latvijā. Salīdzināti un izvērtēti multiplo ovulāciju un embriju ieguvi ietekmējošie faktori, tai skaitā piena somatisko šūnu skaits, 7 Latvijas Zilās (LZ), 13 Latvijas Brūnās (LB) un 10 Dānija Sarkanās (DS) šķirnes donorgovīm, kopskaitā $n=30$ (2 teles (telēm SŠS nevērtēja), 7 pirmpienes un 21 vairāku laktāciju govs) (3. tabula). Pētījuma laikā donori, no 1 līdz 8 govīm katrā saimniecībā, atradās savā saimniecībā.

Donorgovīm laktāciju skaits vidēji (SE) bija 3.6 (2.4) laktācijas. Divi donori bija teles 1.7 (0.14) gadus vecas, bet 28 donori – govīs (7 pirmpienes 2.6 (0.1) gadus vecas un 21 vairākas reizes atnesušās govīs 7.2 (0.7) gadus vecas). Tabulā (3. tabula) parādīts, ka 17 donori (60.7%) bija vecāki par 5 gadiem. Uzsākot

multiplās ovulācijas (MO) inducēšanu, donoru vidējā ķermeņa kondīcija bija 2.7(0.6) BCS punkti un laktācijas dienu skaits 240(30). Ražības un piena kvalitātes raksturojums iepriekšējā mēnesī pirms MO inducēšanas bija: izslaukums 18.1(1.4) kg/dienā, piena tauku % 4.6(0.2), piena olbaltumvielu % 3.8(0.1) un somatisko šūnu skaits 165(17) tūkst. šūnas mL⁻¹.

**3. tabula/ Table 3. Donorgovis raksturojoši rādītāji, vidējais (SE)/
Characteristics parameters of the donor cows, mean (SE)**

Rādītājs/ Parameter	Pirmienes/ <i>Primiparous cows</i>	Vairāku laktāciju govis/ <i>Multiparous cows</i>	Visas govis/ <i>All cows</i>
Govju skaits/ <i>The number of cows</i>	7	21	28
Laktāciju skaits/ <i>The number of lactations</i>	1.0 (0)	4.4 (0.5)	3.6 (2.4)
Vecums, gadi/ <i>Age, years</i>	2.6 (0.1)	7.2 (0.7)	6.1 (0.6)
Ķermeņa kondīcija, BCS vien./ <i>Condition of body, BCS units</i>	2.5 (0.1)	2.8 (0.7)	2.7 (0.6)
Laiks no atnešanās līdz MO, dienas/ <i>Duration from calving to MO, days</i>	156 (39)	268 (37)	240 (30)
Izslaukums, kg diena ⁻¹ / <i>Milk yield, kg day⁻¹</i>	14.9 (2.0)	18.9 (1.7)	18.1 (1.4)
Piena tauki, %/ <i>Milk fat, %</i>	5.0 (0.6)	4.6 (0.2)	4.6 (0.2)
Piena olbaltumvielas, %/ <i>Milk protein, %</i>	3.6 (0.3)	3.9 (0.1)	3.8 (0.1)
SŠS, tūkst. šūnas mL ⁻¹ / <i>SCC, thousand cells mL⁻¹</i>	44 (18)	225 (17)	165 (17)
Donori, kas vecāki par 5 gadiem, %/ <i>Donors aged >5 years, %</i>	0	81.0	60.7

Pētījuma 3. bloks ir daļa no ERAF projekta "Govju ģenētisko resursu saglabāšana Latvijā pielietojot embriju transferenci un ar to saistītās biotehnoloģijas" (Nr.1.1.1.1/16/A/025, 2017-2020. g.) visi protokoli un procedūras, kas projekta ietvaros tiks veiktas ar govīm, bija izvērtētas un atzītas Latvijas Lauksaimniecības universitātes Dzīvnieku labturības un aizsardzības ētikas padomē (atzinums nr. 17/2 no 2017.gada 22. jūnijā).

Pētījumā izmantoto metožu apraksts

Tesmeņa ceturkšņu piena paraugu iegūšana (B1)

Pētījuma blokā B1 govs tesmeņa ceturkšņu sākuma slaukuma piena paraugi SŠS un piena sastāva noteikšanai, kā arī bakterioloģiskai izmeklēšanai iegūti divas reizes ar 10...14 dienu intervālu. Visā pētījumā iegūti un izmeklēti 352 ceturkšņu sākuma slaukuma paraugi no 45 govīm SSS un piena sastāva noteikšanai un 352 aseptiski iegūti ceturkšņu sākuma slaukuma paraugi mastīta ierosinātāja bakterioloģiskai noteikšanai. Tas darīts govs slaukšanas laikā pēc govs pupu tīrīšanas un pirmo piena strūklu atslaukšanas AMS darba stacijā. Uz paraugu iegūšanas laiku slaukšanas robotā tika ieslēgts īslaicīgas pauzes režīms. Vispirms no katras ceturkšņa marķētā plastmasas stobriņā, kurā ievietota konservanta *BSM II* tablete, ieslauca pienu SSS un piena sastāvu (tauku %, olbaltumvielu %, laktozes % un urīnvielas satura mg dL⁻¹) noteikšanai. Tad manuāli dezinficēja pupu galus ar 70% etilspirta šķidumā piesūcinātu kokvilnas marles salveti un četros sterilos stikla stobriņos aseptiskā veidā ieslauca pienu bakterioloģiskai testēšanai. Stobriņu atvēra tieši pirms piena parauga ieslaukšanas, un, to tuvinot pupa galam, piena strūklu virzīja horizontāli. Pēc piena ieslaukšanas stobriņu uzreiz noslēdza ar gumijas korki. Stobriņus uzreiz atdzēsēja auksta ūdens peldē (+5 °C). Visus parauga stobriņus reizē izņēma no ūdens, nosusināja un ievietoja aukstumsomā uz ledus elementiem. Paraugus bakterioloģiskai izmeklēšanai 12 h laikā transportēja un uzsāka to izmeklēšanu VMF Klīniskā institūta Ganāmpulka veselības un reprodukcijas problēmu laboratorijā Jelgavā. Paraugus SSS un piena sastāva analīzēm 72 h laikā nogādāja uz izmeklēšanu (SIA "Piensaimnieku laboratorija", Ulbroka). SSS rezultātu vērtēšanai tesmeņa ceturkšņu pienā šajā darbā izmanto robežvērtību 100 tūkst. šūnas mL⁻¹, kas atbilst somatisko šūnu skaita vērtējumam SCS = 3.0 log₂ vienībām.

Mastīta ierosinātāju noteikšana (B1)

Govs tesmeņa ceturkšņu sākuma slaukuma piena paraugus primāri uzsēja uz Kolumbijas asins agara (Biolife, Italy) ar 5% govju asiņu piedevu un kultivēja 37°C temperatūrā. Izmeklēšanas secība un izolātu klasifikācija veikta saskaņā ar ASV Nacionālās mastīta padomes (NMC) "Laboratorijas un lauka rokasgrāmatā par govu mastītu" aprakstīto metodiku (National Mastitis Council, 1987, 2017). Pieni paraugu uzsēja uz barotnes ar vienreizlietojamu plastmasas bakterioloģisko cilpu (0.01 mL). Inokulētās plates inkubēja un bakterioloģisko audzi novērtēja pēc 24 un 48 stundām. No izaugušajām baktēriju kolonijām gatavoja uztriepes, tās krāsoja ar Grama krāsām (Benex Limited, Īrija), novērtēja, pārbaudīja ar katalāzes testu, oksidāzes testu un pārsēja uz diferenciālajām

barotnēm. Mastīta ierosinātāju identificēšanai līdz grupu, ģinšu un sugu līmenim lietoja mannitola-sāls agaru, (Oxoid Limited, Lielbritānija), žults-eskulīna agaru (Benex Limited, Irija) un Mak-Konkija agaru N2 (Biolife, Itālija). *Staphylococcus aureus* (koagulāzes pozitīvi stafilocoki) apstiprināja ar truša plazmas testu, lietojot stobriņus ar 0.5 mL truša plazmas (Benex Limited, Irija). *Streptococcus agalactiae* apstiprināja ar CAMP testu, bet *Streptococcus uberis* pēc fakta, ka streptokoku pārsējums uz žults-eskulīna agara neveido saskatāmas kolonijas, bet ir novērojama eskulīna hidrolīzes josla ap barotnes inokulēšanas līniju. Gramnegatīvas baktērijas pārsēja uz Mak-Konkija agara N2 (*MacConkey agar N2*) barotnes un sarkanās kolonijas, ko aptver precipitācijas josla, identificēja kā *Escherichia coli*. Visi pārējie ierosinātāji tika klasificēti ģints līmenī (koagulāzes negatīvi stafilocoki (KNS) jeb *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, un *Corynebacterium spp.*). Viena vienīga kolonija tika uzskaitīta par nozīmīgu atradi tikai tad, ja uzsējumā nebija citu koloniju (National Mastitis Council, 2017).

Majorpatogēniem mastīta ierosinātājiem (MaP) pieskaita: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, eskulīna pozitīvi streptokoki, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, pārējās koliformas, *Enterococcus spp.*, *Trueperella pyogenes*, *Pasteurella spp.* un *Pseudomonas spp.*. Koagulāzes negatīvus stafilocokus un korinebaktērijas pieskaita minorpatogēniem mastīta ierosinātājiem (MiP) (Dingwell, Leslie et al., 2003; Piepers, Opsomer et al., 2010). Gadījumā, ja tesmeņa ceturķšņa pienā vienlaicīgi vai kādā no divām piena paraugu izmeklēšanas reizēm konstatējams gan MaP, gan MiP, summārā vērtējumā šis ceturksnis tiek vērtēts kā MaP skarts tesmeņa ceturksnis. Par **ilgstošu MaP** vai **ilgstošu MiP** klātbūtni apzīmēta viena un tā paša ierosinātāja izolēšana no ceturķšņa piena sākuma slaukuma gan pirmajā, gan otrajā piena paraugu iegūšanas un izmeklēšanas reizē. Par **ierosinātāja parādišanos** šajā pētījumā apzīmēta situācija, kad tesmeņa ceturķšņa sākuma slaukuma piena paraugā pirmajā izmeklēšanas reizē ierosinātāju nekonstatē, bet atrod tikai otrajā paraugu nemšanas reizē. Par **epizodisku MaP** klātbūtni nosaukti tie gadījumi, kas MaP konstatēts tikai vienā, t.i. tikai pirmajā vai tikai otrajā paraugu iegūšanas reizē, bet attiecīgi otrā reizē konstatēts MiP vai negatīva atrade. Par **epizodisku MiP** klātbūtni nosaukti tie gadījumi, kuros MiP konstatēts tikai vienā, t.i. tikai pirmajā vai tikai otrajā paraugu iegūšanas reizē, bet attiecīgi citā reizē konstatēts fenotipiski atšķirīgs MiP vai negatīva atrade (4. tabula).

4. tabula/ Table 4. Mastīta ierosinātāju grupas un to klātbūtnes apstiprinājuma interpretācija govs tesmeņa ceturkšņa līmenī/
Interpretation of the mastitis pathogens` group and those presence approval at the cow`s udder quarter level

Ierosinātāja klātbūtnes pastāvīgums/ <i>The permanence of the pathogen's presence</i>	Ierosinātāja grupa/ <i>The group of pathogens</i>	Slēdziens par ierosinātāja grupu/ <i>Summary classification of the pathogen's group</i>	
Pirmā parauga nēmšanas reizē/ At the 1 st sampling	Otrā parauga nēmšanas reizē ¹ / At the 2 nd sampling		
Ilgstoša klātbūtnē/ <i>Continuous</i>	MaP ²	MaP	Ilgstoš MaP/ <i>Continuous MaP</i>
	MiP ³	MiP	Ilgstoš MiP/ <i>Continuous MiP</i>
Epizodiska klātbūtnē/ <i>Episodic</i>	MaP	...	Epizodisks MaP/ <i>Episodic MaP</i>
	...	MaP	
	MaP	MiP	
	MiP	...	Epizodisks MiP/ <i>Episodic MaP</i>
	...	MiP	
	MiP	MiP ⁵	
Bez ierosinātāja klātbūtnes/ <i>No presence of pathogen</i>	Brīvs no ierosinātāja/ <i>Free of pathogen</i>

¹ otrs piena paraugs iegūts 10 līdz 14 dienas pēc pirmā parauga nēmšanas laika/ *the second sampling of milk was conducted 10 to 14 days after the first sampling time;*

² majorpatogēns mastīta ierosinātājs/ *major bacterial udder pathogen;*

³ minorpatogēns mastīta ierosinātājs/ *minor bacterial udder pathogen;*

⁴ audzi neveido/ *none growth;*

⁵ otrā reizē fenotipiski atšķirīgs MiP/ *a different minor MiP was found at the second sampling time.*

Govis, kurām visu tesmeņa ceturkšņu pienā konstatē negatīvu atradi, klasificē kā "statuss bez patogēna". Govis, kurām viena vai vairāku tesmeņa ceturkšņu pienā konstatē vienu un to pašu ierosinātāju, klasificē kā "statuss ar vienu patogēnu". Govis, kurām tesmeņa ceturkšņu pienā dažādos ceturkšņos konstatē dažādus IMI, klasificē kā "statuss ar multiplu patogēnu". Gadījumā, ja vienam un tam pašam dzīvniekiem konstatē vienlaicīgi gan MaP, gan MiP, govs tiek klasificēta kā MaP skarts dzīvnieks.

Tesmeņa ceturkšņu piena sastāva noteikšana (B1)

Tesmeņa ceturkšņu piena sākuma slaukuma paraugi SŠS un piena sastāva noteikšanai ar laboratorijas instrumentālo metodi tika ieslaukti tieši no govs 40 mL plastmasas stobriņos un uzreiz pēc iegūšanas konservēti ar 0.02% 2-brom-2-

nitropropān-1,3-diolu (BronopolTM) jeb BSM II tabletī. Uz akreditētu laboratoriju (SIA “Piensaimnieku laboratorija”, Ulbroka, Latvija) šie paraugi nogādāti un izmeklēti 72 h laikā.

SŠS mērīts ar laboratorijas instrumentālo fluorescentoptoelektroniskās šūnu plūsmas citometrijas metodi neapstrādātam pienam, izmantojot automātisko piena analizatoru Fossomatic FC (FOSS, Hilleroed, Dānija) (LVS EN ISO 13366-2:2007 aktuālā versija).

Tauku %, olbaltumvielu % un laktozes % saturs mērīts ar laboratorijas instrumentālo vidējo-infrasarkano staru spektrofotometrijas metodi, izmantojot lieljaudas pilnīgi automātisko analizatoru MilkoScan FT 6000 (FTIR, FOSS, Hilleroed, Dānija) un atbilstoši ISO standarta prasībām (ISO9622/IDF141:2013 aktuālā versija). Urīnvielas koncentrācija (mg dL^{-1}) noteikta ar laboratorijā validētu metodi MET-003.

Piena pārraudzības analīžu dati (B1, B2, B3)

Par katu pētījumā iekļauto govi piena pārraudzības dati iegūti Latvijas lauksaimniecības datu centrā no govju ciltskartīņām. Pētījuma blokā B1 datu kopa papildināta ar attiecīgā gada septembra un oktobra piena pārraudzībā reģistrēto govs izslaukumu, somatisko šūnu skaitu, tauku %, olbaltumvielu % un laktozes % saturu. Pētījuma blokā B2 datu kopa papildināta ar somatisko šūnu skaita rādītājiem. Pētījuma blokā B3 datu kopa papildināta ar piena pārraudzībā reģistrēto govs izslaukumu, somatisko šūnu skaitu, tauku %, olbaltumvielu % un laktozes % saturu par pašreizējo mēnesi, kad uzsākta donorgovs sagatavošana multiplās ovulācijas ierosināšanai, kā arī vienu mēnesi iepriekš reģistrēto govs izslaukumu, somatisko šūnu skaitu, tauku %, olbaltumvielu % un laktozes % saturu.

Slaukšanas robota sensoru reģistrēto datu iegūšana no ganāmpulka pārvaldības sistēmas (B1; B2)

Pētījuma bloka B1 izstrāde veikta piena ražošanas saimniecībās ar viena ražotāja automātiskās slaukšanas sistēmu (VMS, DeLaval, Zviedrija). Piena elektrovadītspejas mērījumi un izslaukuma dati reģistrēti govs slaukšanas laikā piena plūsmai no tesmeņa ceturķšņiem. Papildus reģistrēti slaukšanas intervālu garumi un OCC rezultāti (S1) katrai govij, kā arī notikušo slaukšanas reižu skaits dienā. Visi dati par trīs nedēļu garu periodu, izņemot MDi datus, no slaukšanas robota datora apkopoti ganāmpulka pārvaldības sistēmā un iegūti no sistēmas pilnā datu dublējuma kopijas par trīs nedēļas garu periodu. MDi datu dinamikas izpēte veikta 2010. gada oktobrī. Dati apkopoti vienreiz dienā, saglabājot

ganāmpulka pārvaldības sistēmas ekrānuzņēmumus, jo MDi tika aktualizēts katrā slaukšanas reizē un iepriekšējās vērtības sistēmā neuzkrājas.

Pētījuma bloka B2 izstrādes laikā uz vietas saimniecībā S3 no slaukšanas robotu (Astronaut A4, Lely, Niderlande) datoriem tika saglabāts ziņojums par somatisko šūnu skaitu, kas mērīts ar viskozitātes metodi, kā arī govs identifikācijas numurs un slaukšanas laiks.

Govs vispārējā un speciālā izmeklēšana (B3)

Tika noskaidrota katras donorgovs anamnēze par laiku kopš pēdējās atnešanās. Pirms uzsāka multiplās ovulācijas inducēšanu, veica vispārējo klīnisko izmeklēšanu un ginekoloģisko izmeklēšanu. Multiplās ovulācijas inducēšanai tika izmantotas tikai praktiski veselas govvis, bez ginekoloģiskām slimībām, ko noteica, veicot rektālu izmeklēšanu, dzemdes un olnīcu ultrasonogrāfiju. Pirms multiplās ovulācijas inducēšanas govij bija novēroti divi normāla garuma meklēšanās cikli. Govs ķermeņa kondīcijas vērtēšana veikta pēc 5 punktu skalas ar soli 0.25 (Ferguson, Galligan et al., 1994). MO inducēšanu uzsāka, ja donorgovs ķermeņa kondīcija bija robežās no 1.50 līdz 4.50 punktiem. Govju asinīs ar ekspresmetodi (Free Style Optium Neo, Abbot Laboratories Ltd, Lielbritānija) mērīja β -hidroksibutirāta (BHB) koncentrāciju. Pētījumā neiekļāva govis ar $BHB > 1.2 \text{ mmol L}^{-1}$.

Asiņu bioķīmisko, hematoloģisko un hormonu rādītāju noteikšana (B3)

Asiņu paraugus seruma bioķīmisko rādītāju, hematoloģisko rādītāju un progesterona (P4) koncentrācijas noteikšanai no visām donorgovīm ieguva MO indukcijas uzsākšanas dienā. Atkārtoti asiņu paraugi P4 noteikšanai turpmāk noņemti pirms PGF2 α injicēšanas, 1.mākslīgās apsēklošanas (MA), 2.MA dienā un embriju izskalošanas (EF) dienā. Asiņu paraugus noņēma 7 mL vakuteineros (HumaTube Serum C/A (z), Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH, Vācija), punktējot *vena caudalis lateralis superficialis*. Pēc noņemšanas paraugus ievietoja portatīvā aukstuma kamerā (Model CNG01-B, Tortona Alexandria, Itālija) uz ledus elementiem temperatūrā, kas nav augstāka par +4 °C uz 4-8 h. Paraugus centrifugēja 12 min (1500 apgriezeni min^{-1}), lai atdalītu serumu, ko uzreiz nogādāja laboratorijā bioķīmisko rādītāju noteikšanai, kā arī daļu dekantēja atsevišķā stobriņā un to uzglabāja -20 °C temperatūrā līdz P4 koncentrācijas mērīšanai. Asiņu serumā tika mērīti šādi metabolīti un elektrolīti: kopējais proteīns (TP), albumīns, urīnviela, kreatīnīns (CREA), aspartāta aminotransferāze (AST), alanīna aminotransferāze (ALT), sārmainā fosfatāze (ALP), laktāta dehidrogenāze (LDH), gamma glutamiltransferāze (GGT), holesterols (CHOL), triglicerīdi (TRG), kalcijss (Ca), magnijs (Mg),

fosfors (P), kālijs (K), nātrijs (Na) un hlorīdi (Cl). Serumā bioķīmijas analīzes veica akreditētā laboratorijā SIA “Centrālā laboratorija”.

Seruma P4 analīzes veica Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides ziņātniskajā institūtā “BIOR” ar VIDAS® Progesterona enzimātisko fluorescences imūntestu (Biomerieux SA, RCS Lyon, Francija). Analīžu iekšējās un ārējās rezultātu izkliedes koeficients <5%. P4 mērījumu diapazons no 0.80 nmol L⁻¹ līdz 254.40 nmol L⁻¹, ar noteikšanas slieksni 0.80 nmol L⁻¹. Paraugi ar P4 koncentrāciju >254.4 nmol L⁻¹ tika atšķaidīti ½ un analizēti vēlreiz.

Bioķīmisko un hematoloģisko rādītāju references vērtības iegūtas no vispāratzītiem literatūras avotiem (Kaneko, Harvey et al., 2008; Latimer, 2011).

Multiplās ovulācijas inducēšana, embriju ieguve un novērtēšana (B3)

Visas B3 pētījumu bloka govis tika pakļautas multiplās ovulācijas (MO) izraisīšanai vienu reizi, ne ātrāk kā 80 dienās pēc govs atnešanās. Visas govis presinhronizēja ar divām prostaglandīna F2 alpha (PGF2α) analoga – kloprostenola injekcijām (Oestrophan; Bioveta, Čehija) deva 500 µg intramusculāri (im) ar 14 dienu starplaiku. Dzimumcikla 9 līdz 12 dienā goviem uzsāka MO inducēšanu pēc diviem standartizētiem superovulācijas protokoliem (Hasler et al., 1983).

Corpus luteum luteolīzi ierosināja ar PGF2α 500 µg im 48 h pēc eCG (pirmais protokols) vai vienā laikā ar pFSH 6. injekciju (otrais protokols). Govs divreizēju mākslīgo apsēklošanu (MA) izdarīja 48 h un 60 h pēc PGF2α injekcijas, bet, ja govs turpināja izrādīt meklēšanās pazīmes, 12 h vēlāk veica atkārtotu MA.

Embriju izskalošanas dienā, kas ir 7. diena pēc pirmās MA, noteica donora olnīcās esošo *corpus luteum* skaitu, lietojot ultrasonogrāfisko skeneri ar lineāro 5 MHz intrarektālo zondi. Lai novērstu dzīšanos, epidurāli lietoja 100 mg prokaīna hidrohlorīdu (5 mL Procamidor 20 mg mL⁻¹, Richter Pharma AG, Austrija). Embriju izskalošanai pielietoja divvirzienu silikona ET katetru ar Y savienotāju un embriju filtru. Katru dzemdes ragu izskaloja ar BoviFlusch Recovery Medium (Minitüb GmbH, Vācija), patēriņojot nepārtrauktā plūsmā 500 mL un filtrējot caur EmGuard System for Embryo Collection Bovine/Equine (Minitüb GmbH, Vācija). Filtru sistēmu ar iegūto materiālu pārvietoja uz atsevišķu tīru telpu. Pēc filtra atvienošanas veica tā skalošanu un šķiduma pārnešanu uz vairākām Petri platēm. Petri plates caurskatīja desmit reižu palielinājumā ar stereomikroskopu (Nikon, Japan), lai atrastu embrijus. Atrastos embrijus ar speciālās pipetes palīdzību pārnese mazākās Petri platēs 5 mL speciālā embriju kultivēšanas šķidumā BoviHold medium (Minitube GmbH, Vācija), tos turēja istabas temperatūrā līdz to kvalitātes novērtēšanai mikroskopā 100 reižu palielinājumā. Embrijus pēc to morfoloģiskām pazīmēm iedalīja: neapauglotas olsūnas (1. attīstības pakāpe), embriji līdz morulas stadijai (2. attīstības pakāpe) morulas (3. attīstības pakāpe), kompaktās morulas

(4. attīstības pakāpe), agrīnās blastocistas (5. attīstības pakāpe) blastocistas (6. attīstības pakāpe), paplašinātās blastocistās, t.i., embriji pirms iznākšanas no *zona pellucida* (7. attīstības pakāpe), un izšķilišies embriji, kas iznākuši ārpus *zona pellucida* (8. attīstības pakāpe). Embriju kvalitāti noteica klasēs (1. klase = teicams, 2. klase = labs, 3. klase = viduvējs, 4. klase = slikts un 5. klase = degenerēts) atbilstoši tam, kā to ir aprakstījuši Bó un Mapletoft (2013). Kopējais embriju skaits (nE) tika aprēķināts summējot visas attīstības pakāpes un visu kvalitātes klašu embrijus, tai skaitā degenerētos embrijus. Transferencei derīgo embriju skaitu (nTE) aprēķināja summējot visus pirmās, otrās un trešās klasses embrijus, kas ir piemēroti tiešai embriju pārnešanai uz recipientu vai sasaldēšanai (Bó & Mapletoft, 2013).

Ceturtajā dienā pēc embriju izskalošanas donoriem injicēja PGF2 α im, lai izsauktu *corpus luteum* luteolīzi un atjaunotu meklēšanās cikliskumu (Viana, Vargas et al., 2016).

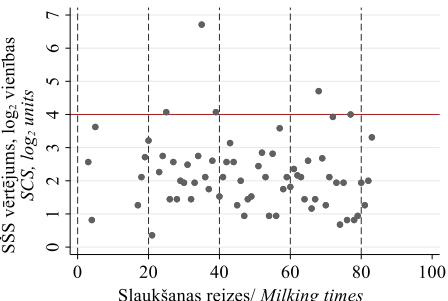
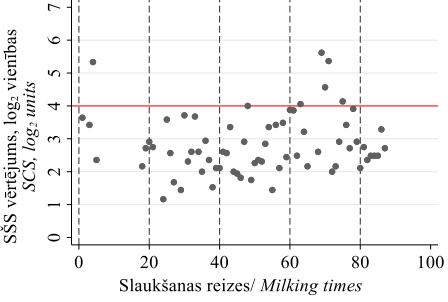
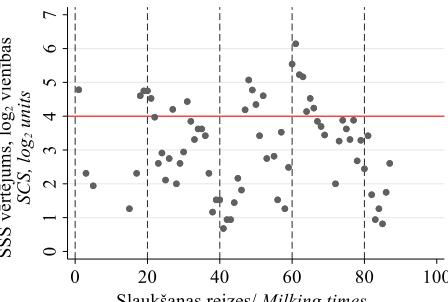
Govs somatisko šūnu skaita individuālās dinamikas tipa noteikšana (B1)

Apkopojot OCC mērījumu rezultātus, kas automātiskajā slaukšanas sistēmā iegūsti katrā slaukšanas reizē un attēlojot tos grafiski, katras govs somatisko šūnu skaita svārstības parāda individuālās dinamikas tendences, kurus šajā pētījumā ir aprakstītās kā četri SSS individuālās dinamikas tipi. Atkarībā no somatisko šūnu skaita vērtējuma SCS punktu izkliedes un novietojuma attiecībā pret robežvērtību SCS = 4, kas atbilst SSS = 200 tūkst. šūnas mL $^{-1}$, govis iedalīja četros SSS individuālās dinamikas tipos (5. tabula).

5. tabula/ *Table 5. Četri SSS individuālās dinamikas tipi un to vērtēšana/ Four types of individual dynamics of SCC and their evaluation*

SSS svārstības pa govs slaukšanas reizēm/ Fluctuations of SCC in cow's consecutive milking	Dinamikas tipa nosaukums un raksturojums/ Dynamics type name and characterization
<p>Scatter plot showing SSS fluctuations over consecutive milkings. The y-axis is 'SSS vērtējums, log: units' ranging from 0 to 7. The x-axis is 'Slaukšanas reizes/ Milking times' ranging from 0 to 100. A horizontal red line is drawn at approximately 4.0. Data points are scattered below this line, indicating low SSS values.</p>	<p>Dinamika zem robežvērtības (1.tips). Piemērs: govs nr.7292 ar pastāvīgi zemu SSS pienā/ Dynamics below threshold (Type 1). Example: cow nr.7272 with permanently low SCC in milk.</p>

5. tabulas turpinājums/ continuation of Table 5

SŠS svārstības pa govs slaukšanas reizēm/ Fluctuations of SCC in cow's consecutive milking	Dinamikas tipa nosaukums un raksturojums/ Dynamics type name and characterization
	Dinamika zem robežvērtības ar īslaicīgu paaugstināšanos (2.tips). Piemērs: govs nr.7248 ar sporādiskiem SSS paaugstinājumiem atsevišķas slaukšanas reizēs/ Dynamics below threshold with separate increases (Type 2). Example: cow nr.7248 with occasional increases of SCC in some milkings.
	Dinamika pie robežvērtības (3.tips). Piemērs: govs nr.7467 ar SSS epizodisku kāpumu, jo laikā no 60 līdz 80 slaukšanas reizei novērots īslaicīgs SCS kāpums, kam seko atgriešanās iepriekšējā vērtību diapazonā/ Dynamics near threshold (Type 3). Example: cow nr.7467 with a short-time increase of SCC above threshold during 60 th to 80 th milking that was followed by a return into the earlier range of values.
	Dinamika plašā diapazonā zem un virs robežvērtības (4.tips). Piemērs: govs nr.7071 ar SSS svārstībām plašā diapazonā zem un virs robežvērtības un vairāk nekā 30% gadījumu pārsniedz SCS > 4, kas atbilst SSS > 200 tūkst. šūnas mL ⁻¹ / Dynamics in a wide range around threshold (Type 4). Example: cow nr.7071 with SCC fluctuations in a wide range below and above the threshold and more than 30% of milkings exceeding the SCS > 4 or SCC > 200 000 cells mL ⁻¹ .

Tabulā parādītajiem somatisko šūnu skaita individuālās dinamikas piemēriem laika ass ar vertikālām līnijām ir sadalīta pa posmiem, kuru garums aptver 20 slaukšanas reizes. Lai arī ne visās slaukšanas reizēs ir veikta SŠS mērišana ar OCC, tomēr šāds laika posms ir minimālais ilgums OCC rezultātu svārstību salīdzināšanai, lai novērtētu SŠS individuālās dinamikas tipu konkrētai govij.

Datu statistiskā apstrāde

Lai novērtētu atsevišķu govju somatisko šūnu skaita (SŠS) dinamiku, ar OCC noteica SŠS katrā slaukšanas reizē viena mēneša laikā. Dati tika apkopoti ganāmpulka pārvaldības sistēmā un iegūti no slaukšanas robota datu dublējuma datnēm. Lai SŠS rezultāti atbilstu normālajam datu sadalījumam, SŠS tika konvertēts uz somatisko šūnu skaita vērtējuma (SCS), standartizētām log₂ vienībām pēc formulas (1) vai gadījumos, ja kādai govij konstatē ļoti zemu SŠS ≤ 12 tūkst. šūnas mL⁻¹, tad SCS=0. Pēc konvertēšanas SŠS robežvērtība 200 tūkst. šūnas mL⁻¹ atbilst SCS = 4.0 log₂ vienībām (Shook, 1993).

$$SCS = \log_2(S\bar{S} \times 10^{-5}) + 3 \quad (1)$$

SCS – somatisko šūnu skaita vērtējums, log₂ vienības;
SŠS – somatisko šūnu skaits, šūnas mL⁻¹.

Lai raksturotu viskozitātes metodes izmantošanas efektivitāti tādu govju atpazīšanai, kurām pienā ar laboratorijas instrumentālo metodi konstatēts SŠS > 200 tūkst. šūnas mL⁻¹, tika izvērtēts pēc abām metodēm iegūto rezultātu kopējās sakritības līmenis, aprēķinot Koena kappa koeficienta vērtību. Koena Kappa koeficienta interpretācija veikta pēc Landisa un Koha skalas (Landis & Koch, 1977): vāja sakritība $k \leq 0.20$; nosacīta sakritība $0.21 \leq k \leq 0.40$; viduvēja sakritība $0.41 \leq k \leq 0.60$; būtiska sakritība $0.61 < k \leq 0.80$; ļoti laba sakritība $k > 0.80$.

Tāpat iegūtajiem rezultātiem tika aprēķināts arī kļūdaini pozitīvo un kļūdaini negatīvo vērtējumu biežums.

Lai raksturotu viskozitātes metodes SŠS rezultātu kvantitatīvo atbilstību, salīdzinot ar laboratorijas instrumentālās metodes rezultātiem, tika aprēķināts Lina konkordances korelācijas koeficients piecām slaukšanas reizēm un salīdzinātas šī koeficiente vērtības katrai reizei atsevišķi, kā arī vidējām vērtībām no divām, trijām un piecām reizēm ap pārraudzības kontroles testa atskaites reizi. Lina koeficiente aprēķināšana veikta, izmantojot STATA programmas paplašinājumu, ko izstrādājuši Šteihens T.J. un Koks N.J. (Steichen & Cox, 2002). Lina konkordances korelācijas koeficiente interpretācija veikta pēc

MakBraida skalas (Lin, McBride et al., 2005): vāja sakritība $r < 0.90$; viduvēja sakritība $0.90 \leq r \leq 0.95$; augsta sakritība $0.95 < r \leq 0.99$; pilnīga sakritība $r > 0.99$.

Ar viskozitātes metodi noteiktā SSS sakritība ar laboratorijas instrumentālo metodi pārraudzības kontroles dienā novērtēta grafiski, attēlojot rezultātus Bland-Altmana diagrammā (Watson & Petrie, 2010).

MDi dinamika tika apkopota un salīdzināta ar dispersijas analīzes ANOVA metodi atkārtotiem mēriņumiem. Visā pētījumu gaitā atšķirības starp grupām tika uzskatītas par nozīmīgām, ja $p < 0.05$.

Mastīta ierosinātāja klātbūtnes parādīšanās, t.i., ierosinātājs nebija konstatēts pirmajā paraugu ķemšanas reizē, bet ir konstatēts otrajā paraugu ķemšanas reizē, analizēta ar daudzu faktoru logistiskās regresijas analīzi datorprogrammā Stata (*StataCorp LP, 4905 Lakeway Drive, College Station TX77845, USA, version Stata BE 17.0 for Windows*).

Pīrsona Hī-kvadrāta tests izmantots, lai salīdzinātu ierosinātāju grupu sastopamības sadalījumu gadījumu un kontroles grupās. Lai savā starpā izvērtētu atšķirības starp mazākām apakšgrupām ($n \leq 5$), izmantots Fisera eksaktais tests.

Multiplās ovulācijas (MO) sekmes, jeb atbildes reakciju uz MO inducēšanu vērtēja pēc *corpus luteum* skaita (nCL), summējot kreisajā un labajā olnīcā novērotos CL embriju izskalošanas dienā. Atbildes reakciju uz MO inducēšanu uzskatīja par sekmīgu, ja nCL ≥ 3 .

Lai statistiski izvērtētu sakarību starp nCL (nCL modelis) un sēruma bioķīmiskiem rādītājiem, piena SSS un govs izslaukumu, laktāciju skaitu un apkārtējās vides gaisa temperatūru pirms MO inducēšanas, izmantoja daudzfaktoru negatīvās binomiālās regresijas modeli (MNBR). Govs šķirni automātiski iekļāva modeli kā blakusfaktoru, neraugoties uz tā statistiskā nozīmīguma līmeni. Līdzīgā veidā MNBR metode izmantota interpretējot nE un nTE, attiecīgi modelis nE un modelis nTE, potenciāli ietekmējošos faktorus: progesterona (P4), 17β -estradiola (E2) līmeni, asinu bioķīmiskos rādītājus, hematoloģiskos rādītājus, ķermeņa kondīciju (BCS), laktāciju skaitu, apkārtējās vides gaisa temperatūru, piena SSS, izslaukumu, piena tauku, un olbaltumvielu saturu (Dohoo, Martin et al., 2010).

Pētījuma gaitas apraksts

Visā pētījuma gaitā (6. tabula) somatisko ūnu skaits govs pienā ir analizēts kā indikators produktīvai govs tesmeņa darbībai, kvalitatīva piena ieguvei un arī labvēlīgai ietekmei uz govs reproduktīvās sistēmas spējām, konkrēti, multiplo ovulāciju un transferencei derīgu embriju ieguvī.

6. tabula/ *Table 6. Pētījuma izpildes gaita pa gadiem atbilstoši darba uzdevumiem, materiāla iegūšanai un rezultātu publicēšanai/ Year-by-year progress of the study according to objectives, material acquisition, material acquisition, and publication of results*

Darba uzdevums/ Objective of the study	Dzīvnieku bloks/ Animal block	Pētījuma dizains un rezultātu vērtēšana/ Study design and evaluation of results
Izpētīt MaP un MiP ietekmi uz SSS govs pienā subkliniskas intramammārās infekcijas gadījumos/ <i>To investigate the effects of MaP and MiP on the SCC in cow's milk in cases of subclinical intramammary infection;</i>		Gadījuma-kontroles pētījums. Logistikā regresija/ <i>Case-control study. Logistic regression.</i>
Novērtēt OCC precizitāti, lai apzaļītu govis ar SSS > 200 tūkst. šūnas mL^{-1} / <i>To assess the accuracy of the OCC to recognize cows with SCC > 200 000 cells mL^{-1};</i>	B1, n=45	Diagnostiskās metodes izvērtējums. SSS salīdzinājums aikarībā no mastīta ierosinātāja un MDi/ <i>Evaluation of the diagnostic method. Comparison of SCC dynamics depending on presence of the mastitis pathogens and MDi.</i>
Novērtēt MDi vispārējo efektivitāti, lai apzaļītu govis ar SSS > 200 tūkst. šūnas mL^{-1} un novirzītu nepieliekamas kvalitātes pienu/ <i>To assess the overall effectiveness of MDi to recognize cows with SCC > 200 000 cells mL^{-1} and for the automatic diversion of under quality milk;</i>	-	Diagnostiskās precizitāte pēc Koena, Lina un Bland-Altmana metodēm./ <i>Diagnostic performance using Cohen, Lin's, and Bland-Altman methods.</i>
Novērtēt SSS sensora MQC-C2, kas darbojas pēc viskozitātes principa, mērījumu precizitāti un diagnostisko sakritību ar laboratorijas instrumentālo metodi/ <i>To assess the accuracy of measurements of the viscosity-based SCC sensor MQC-C2 and the overall diagnostic agreement with the laboratory instrumental method;</i>	B2, n=111	Šķērsgriezuma pētījums. Negatīvā binomīlā regresija./ <i>Cross-sectional study. Negative binomial regression.</i>
Izvērtēt <i>corpus luteum</i> skaitu pēc MO, kopējo un transferēcēi derīgo embriju skaitu aikarībā no SSS pienā/ <i>To evaluate the number of corpus luteum, the total number, and the number of transferable embryos after MO depending on the SCC in donor's milk.</i>	B3, n=30	■ - materiāla iegūšana/ material acquisition; ▶ - rezultātu publicēšanai/ publication of results.

Nemot vērā to, ka šīs tēmas izstrādes gaitā bija unikāla iespēja pētīt apdraudētu šķirņu ģenētisko resursu govīs, kuras izmitinātas daudzās saimniecībās visā valsts teritorijā, ir noprota ms, kāpēc tās nav pētījuma laikā slauktas slaukšanas robotā. Noslēdzošais pētījuma bloks B3 ļauj pārbaudīt hipotēzi par to, ka govīm ar optimālu somatisko šūnu skaitu pienā un veselu tesmeni ir sagaidāmi labāki reprodukcijas rezultāti. Pētījuma izstrādes laiks un trīs unikāli pētījuma materiāla bloki, kas ir tematiski vienoti jautājumā par SSS vērtēšanas dažādo tehnisko risinājumu iespējām, ir nepieciešami, lai parādītu SSS rezultātu kompleksās vērtēšanas zinātnisko nozīmi un praktiskā pielietojuma aspektus govju tesmeņa veselības uzlabošanā un govju šķirņu saglabāšanā, kas ir svarīgi gan veterinārmedicīnas, gan lopkopības nozaru attīstībai un ciešākai sadarbībai.

PĒTĪJUMA REZULTĀTI UN DISKUSIJA

Piena SŠS atkarībā no ierosinātāja klātbūtnes un MDi

Pētījuma bloka B1 datu kopu veido rezultāti, kas iegūti, veicot atkārtotu tesmeņa ceturkšņa līmeņa bakterioloģisko izmeklēšanu (majorpatogēno un minorpatogēno mastīta ierosinātāju klātbūtnē), sastāva testēšanu (piena tauku%, olbaltumvielu%, laktozes%, urīnvielas koncentrācija) un somatisko šūnu skaita (SŠS) mērījumus ar laboratorijas instrumentālo metodi akreditētā laboratorijā, 45 govīm no diviem ganāmpulkiem dažādās Latvijas vietās.

Govs tesmeņa ceturkšņus klasificēja pēc intramammārās infekcijas (IMI) statusa, ko noteica bakterioloģiskās izmeklēšanas rezultātu interpretācija. Mastīta ierosinātāja klātbūtnei izšķirti trīs tipi: ilgstoša klātbūtnē pienā (ierosinātāju var izolēt atkārtotas pārbaudes laikā), epizodiska klātbūtnē (atkārtotas pārbaudes laikā ierosinātājs nav izolēts) un ierosinātāja klātbūtni nekonstatē. No majorpatogēniem ierosinātājiem (MaP) šajā pētījumā izolēti koagulāzes pozitīvi stafilocoki, eskulīna pozitīvi streptokoki un *Enterococcus spp.*, bet no minorpatogēniem mastīta ierosinātājiem – koagulāzes negatīvi stafilocoki un *Corynebacterium spp.*. Tomēr atsevišķos gadījumos konstatēja jauktu infekciju vai viena ierosinātāja nomaiņu uz citu ierosinātāju 10...14 dienu laikā.

Kopskaitā uz MiP un MaP klātbūtni izvērtēti 176 tesmeņa ceturkšņi no 45 govīm (41 govīj funkcionēja visi četri piena dziedzeri, bet četrām govīm funkcionēja trīs piena dziedzeri).

No visiem tesmeņu ceturkšņiem abās izmeklēšanas reizēs desmit ceturkšņi (5.7%) uzrādīja ilgstošu MaP klātbūtni un 74 (42.0%) ceturkšņi - ilgstošu MiP klātbūtni. Tādējādi ilgstoša mastīta ierosinātāja klātbūtnē bija apstiprināta 47.7% no piena dziedzeriem (84/176). Turpretī epizodisku MaP konstatēja 12 tesmeņa ceturkšņos (6.8%) un epizodisku MiP klātbūtni - 40 ceturkšņos (22.7%). Pārējie 40 piena dziedzeri (22.7%) bija bez pozitīvas bakterioloģiskās atrades abās paraugu iegūšanas reizēs.

Tika konstatēta statistiski nozīmīga atšķirība ($p < 0.05$) mastīta ierosinātāju grupu sastāvā, salīdzinot gadījumu grupas (G) govīs ar augstu MDi vērtību un kontroles grupas (K) govīs ar zemu sākotnējo MDi vērtību. Lielākā atšķirība konstatējama starp to, cik bieži konstatēta epizodiska MaP klātbūtnē pienā, kā arī negatīva bakterioloģiskā atrade. Turpretī ilgstošam MiP abās grupās bija vienāds skaits – 37 ilgstoša MiP ceturkšņi gadījumu grupas govīm un tikpat daudz ilgstoša MiP ceturkšņi arī kontroles grupas govīm (7. tabula).

7. tabula/ *Table 7. Majorpatogēno (MaP) un minorpatogēno (MiP) mastīta ierosinātāju izvietojums govju tesmeņa ceturkšņos/ Distribution of the major pathogens (MaP) and minor pathogens (MiP) in the udder quarters of the cows*

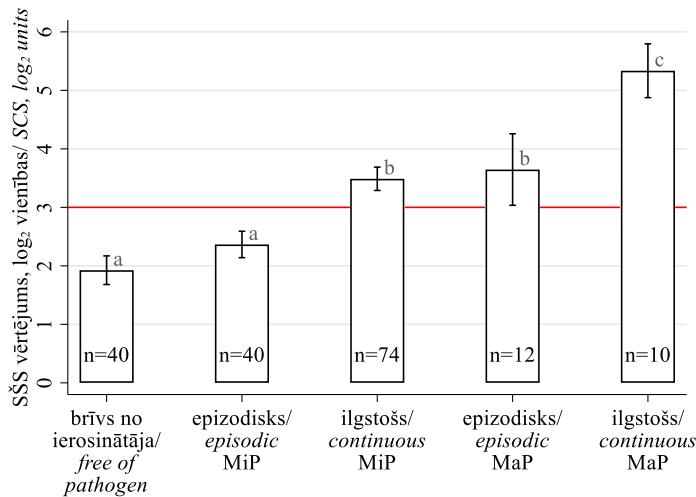
Mastīta ierosinātājs/ <i>Mastitis pathogen</i>	Skarto tesmeņa ceturkšņu skaits (%)/ <i>The number of cow udder quarters (%)</i>	Skartu ceturkšņu skaits grupās/ <i>The number of affected quarters in groups</i> G ¹ / K ²
Ilgstošs/ <i>Continuous</i> MaP	10 (5.7%)	4 / 6
Ilgstošs/ <i>Continuous</i> MiP	74 (42.0%)	37 / 37
Epizodisks/ <i>Episodic</i> MaP	12 (6.8%)	11 / 1
Epizodisks/ <i>Episodic</i> MiP	40 (22.7%)	14 / 26
Brīvs no ierosinātāja/ <i>Free of pathogen</i>	40 (22.7%)	15 / 25
Kopā	176 (100%)	81 / 95
Atšķirības nozīmīgums starp gadījumu un kontroles grupu/ <i>Significance of difference between case and control group</i>	...	p=0.008

¹ G – gadījumu grupa/ *case group cows/*, govis ar MDi ≥ 1.4;

² K – kontroles grupa/ *control group cows/*, govis ar MDi < 1.4.

MaP un MiP klātbūtnei tesmeņa ceturkšņu pienā divās paraugu noņemšanas reizēs ir izteikta sakarība ar SSS. Attēlā parādīts (1. att.), ka vidējais SSS vērtējums log₂ vienībās ir atkarīgs no mastīta ierosinātāja grupas un klātbūtnes pastāvīguma. Viszemākais SCS, nepārsniedzot 3 log₂ vienības jeb 100 tūkst. šūnas mL⁻¹, konstatēts pienā no ceturkšniem, kas ir brīvi no mastīta ierosinātājiem abās piena paraugu ņemšanas reizēs un līdzīgi zems SCS arī tesmeņa ceturkšņu pienā ar epizodisku MiP klātbūtni. Visaugstākā SCS vidējā vērtība, kas pārsniedz 5 log₂ vienības jeb 400 tūkst. šūnas mL⁻¹ novērota pienam no tiem tesmeņa ceturkšniem, kuros konstatē ilgstošu MaP klātbūtni.

Apkopojoši ceturkšņu piena bakterioloģiskās izmeklēšanas rezultātus govs tesmeņa līmenī, viens mastīta ierosinātājs skar 24.4% (11/45) no visām govīm pirmajā paraugu iegūšanas reizē, bet 35.6% (16/45) otrajā paraugu iegūšanas reizē (8. tabula).



1. att./ Fig. 1. Vidējais aritmētiskais SCS govs tesmeņa ceturķņu sākuma slaukuma pienā atkarībā no ierosinātāju klātbūtnes/ *The mean SCS in milk from a cow's udder quarters foremilk depends on the pathogen's presence in milk (free of pathogen / episodic / continuous); ierosinātāja grupa (major patogēni ierosinātāji - MaP / minor patogēnie ierosinātāji MiP)/ pathogen groups (major pathogens – MaP / minor pathogens - MiP); stabīni ar atšķirīgiem burtiem (a, b, c) parāda statistiski nozīmīgu SCS atšķirību starp grupām ($p < 0.05$)/ bars with different superscripts (a, b, c) differ significantly from each other ($p < 0.05$).*

No pirmās uz otro piena paraugu iegūšanas reizi ir mainījusies arī to.govju proporcija, kurām visos četros ceturķņos bakterioloģiskajā testēšanā konstatēta negatīva atrade, attiecīgi 11.1% (5/45) pirmajā un 2.2% (1/45) otrajā reizē. Kopumā novērotās procentuālās atšķirības starp pirmajā un otrajā reizē iegūtiem viena patogēna, vairāku patogēnu un negatīvas atrades govju statusiem neuzrāda nozīmīgas pārmaiņas 10...14 dienu laikā. Tomēr var atzīmēt īpatnības, kas novērotas attiecībā uz skarto tesmeņa ceturķņu skaitu konkrētiem mastīta ierosinātāju veidiem. Koagulāzes pozitīvi stafilocoki un *Enterococcus spp.* parasti govij skar vienu, retāk divus, tesmeņa ceturķņus. Koagulāzes negatīvi stafilocoki un eskuļīna pozitīvi streptokoki konstatējami vienā vai divos ceturķņos, bet ir arī tādas govis, kurām trīs ceturķņi izdala ar pienu šos ierosinātājus. *Corynebacterium bovis* izvietojumam pa govs tesmeņa ceturķņiem novērota lielākā dažādība, jo tas konstatējams gan kā viena ceturķņa patogēns, gan divu, trīs un pat visu četru tesmeņa ceturķņu pienā.

8. tabula/ **Table 8. Mastīta ierosinātāju izvietojums pa tesmēna ceturķšiem/ The disposition of mastitis pathogens across quarters in the cow's udder**

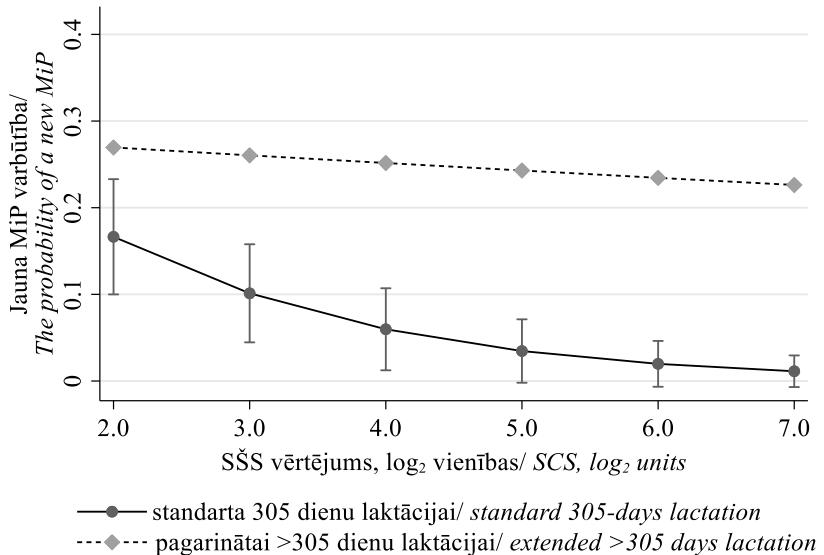
Govis statuss/ The status of the cow	Izvietojums tesmēna ceturķšos/ The disposition across quarters	Pirmaā paraugu iegūšanas reizē/ At the first sampling time						Govis (%)/ Cows (%)		Gadījums + Kontrole/ Case + Control skartas ⁴ / affected [#] brivas ⁵ / free of ⁵ kopā/ in total
		KPS ¹	KNS ²	EDS ³	Enterococcus spp.	Coryne- bacterium spp.	Gadījums + Kontrole/ Case + Control skartas ⁴ / affected [#]			
Otrajā paraugu iegūšanas reizē/ At the second sampling time										
Viens patogēns/ Single pathogen	viens/ in one	-	1	-	-	3	11 (24.4%)	5 (11.1%) 1+4	45 (100%) 21+24	
	divos/ in two	-	2	-	-	2	5+6			
Vairāki patogēni/ Multiple pathogen	trijos/ in three	-	-	1	-	-	2	29 (64.5%) 15+14	15+14	
	četros/ in four	-	-	-	-	-	2			
Viens patogēns/ Single pathogen										
Vairāki patogēni/ Multiple pathogen	viens/ in one	-	1	-	-	3	16 (35.6%)	1 (2.2%) 1+0	45 (100%) 21+24	
	divos/ in two	-	2	-	-	4	6+10			
Vairāki patogēni/ Multiple pathogen	trijos/ in three	-	-	-	-	-	4	28 (62.2%) 14+14	45 (100%) 21+24	
	četros/ in four	-	-	-	-	-	3			

¹ Koagulāžes pozitīvi stafilocoki/ *Coagulase-positive staphylococci*; ² Koagulāžes negatīvi stafilocoki/ *Coagulase-negative staphylococci*; ³ Šķķulina pozitīvi streptokoki/ *Es culin-positive streptococci*; ⁴ Ierosinātājs konstatēts kādā no tesmēna ceturķšiem/ With the pathogen in any of the quarters; ⁵ Visiem tesmēnai ceturķšiem negatīva atradē/ Free of pathogen in all quarters.

Mūsu pētījumā konstatēts, ka *Corynebacterium bovis* parādīšanās otrajā piena paraugu iegūšanas reizē, salīdzinot ar pirmo reizi, parasti notika vienā vai divos tesmeņa ceturkšņos, bet ir iespējama arī trijos ceturkšņos vienlaicīgi. Tas rada pārdomas par iespējamiem risinājumiem, lai samazinātu korinebaktēriju prevalenci ganāmpulkā, kur govju slaukšanai pielieto slaukšanas robotu. Atbilstoši dažu autoru ieteikumam, korinebaktēriju izplatība varētu būt vēl plašāka, jo ir pamats uzskatīt piena dziedzeri par inficētu ar korinebaktērijām pat tad ja SSS < 100 tūkst. šūnas mL⁻¹, bet pienā konstatē korinebaktēriju klātbūtni (Lücke, Wente et al., 2021).

Mastīta ierosinātāja parādīšanās (ierosinātājs nebija konstatēts govs pienā pirmajā paraugu iegūšanas reizē, bet klātbūtnē parādās otrajā piena paraugu iegūšanas reizē) tesmeņa ceturkšņos tika izvērtēta ar jauktā efekta loģistiskās regresijas modeli. MiP iespējamība pieaug, ja pirmajā paraugu ņemšanas reizē ceturkšņa pienā novērots zemāks SSS, turpretī ceturkšņiem ar augstāku SSS jauna MiP parādīšanās otrajā paraugu ņemšanas reizē ir zemāka. Veidojot modeli, ir ņemts vērā fakts, ka viena tesmeņa ceturkšņi savā ziņā nav neatkarīgas vienības, bet viena tesmeņa kopīgas sastāvdaļas. To apstiprina arī datu kopas iekšējā struktūra – varbūtība konkrētā tesmeņa ceturkšņi parādīties jaunai MiP infekcijai pozitīvi korelē ar infekcijas rašanās varbūtību tās pašas govs citos piena dziedzeros (klašu iekšējās korelācijas koeficients ICC = 0.27 ± 0.16; 95% CI 0.07...0.65). Atbilstoši loģistiskās regresijas modelim, standarta laktācijas govīm, ja pirmo piena paraugu iegūšanas reizē tesmeņa ceturkšņa pienā SCS ir vienu vienību zemāks, tad tiek prognozēta 1.8 reizes augstāka iespējamība, ka otrajā piena paraugu ņemšanas reizē būs konstatēta jauna MiP parādīšanās (1/OR = 1/0.56=1.8; p < 0.05). Tai pat laikā govīm ar pagarinātu laktācijas ilgumu > 305 dienas, jauna MiP parādīšanās iespēja nav atkarīga no SSS tesmeņa ceturkšņa pienā, uz ko norāda attēla augšējā līnija bez būtiska varbūtības samazinājuma govs tesmeņa ceturkšņiem ar augstāku SSS (p > 0.05) (2. att.).

Mūsu pētījumā iegūtie rezultāti apstiprinās arī citu autoru darbos (Bexiga, Koskinen et al., 2011), kuri ir padziļināti pētījuši paraugus ar negatīvu bakterioloģisko atradi, proti, 47% no piena paraugiem ar SSS>500 tūkst. šūnas mL⁻¹, veicot atkārtotu parauga izmeklēšanu ar priekšapstrādi (parauga sasaldēšana un atkausēšana) vai lietojot augstākas jutības metodes, piemēram, polimerāzes ķēdes reakciju, beigās tomēr tiek identificēts kāds bakteriāls mastīta ierosinātājs. Literatūrā par AMS atrodami arī autoru novērojumi, ka saimniecībās ar slaukšanas robotu govis retāk inficējas ar *Streptococcus uberis* nekā saimniecībās ar parasto slaukšanu, bet galvenokārt to skaidro ar faktu, ka roboti pārsvarā ir uzstādīti no jauna uzceltās govju novietnēs, kurās vēl nav akumulēta endēmiska mikrobiota (Taponen, Liski et al., 2017).

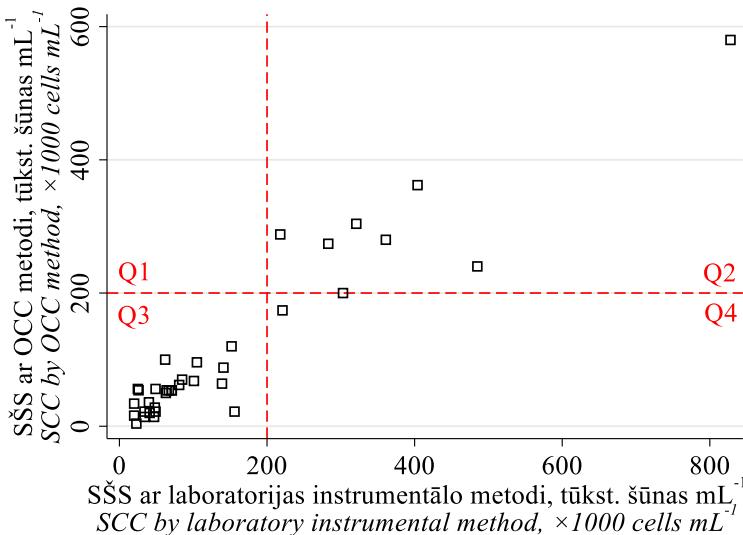


2. att./ Fig. 2. Jaunu minorpatogēnu mastīta ierosinātāju parādīšanās pienā aprēķinātā varbūtība otrajā parauga ņemšanas reizē, atkarībā no tesmeņa ceturkšņa S̄S vērtējuma govīm standarta un pagarinātās laktācijas laikā/
Predicted probability of occurrence of a new minor pathogen in milk at the second sampling, depending on the udder's quarter SCS in cows during standard or prolonged lactation

Attēlā parādīta marginālā prognozētā vidējā vērtība un 95% ticamības intervāls standarta 305 dienu laktācijai, bet pārtrauktā līnija bez ticamības intervāla attēlā norādīta sakarā ar faktoru mijiedarbību / The figure displays the marginal predicted mean and 95% confidence interval in cows during standard 305 day lactation, but dashed line without confidence interval for cows in extended lactation is shown only due to significant interaction.

Tiešsaistes šūnu skaitītāja OCC pielietošanas efektivitāte

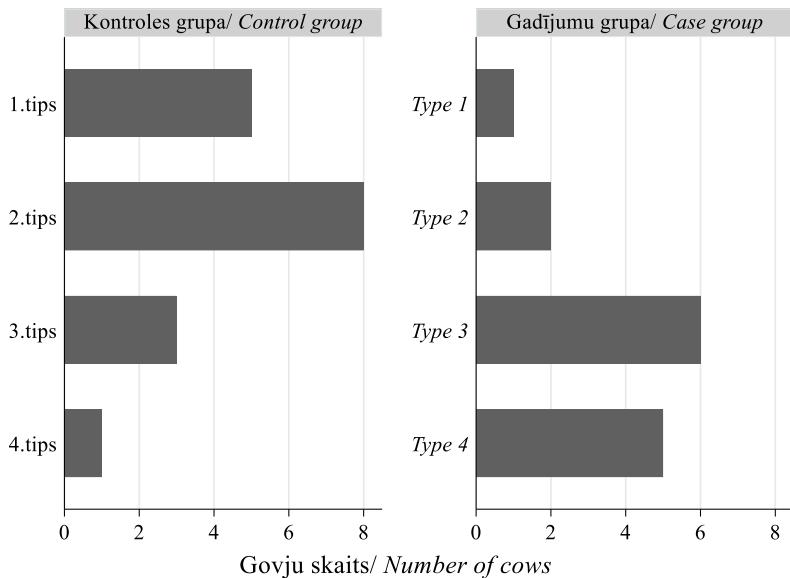
Somatisko šūnu skaits (S̄S), nosakot vienā un tai pašā laikā ar tiešsaistes šūnu skaitītāju (OCC) un ar laboratorijas instrumentālo metodi, ir salīdzināts 31 govij vienā slaukšanas reizē (3. att.). Iegūtie rezultāti un to izvietojums attēlā tikai Q2 un Q3 kvadrantos parāda, ka slaukšanas robotā iebūvētais OCC kā diagnostikas ierīce precīzi atrod govis ar augstu S̄S. Laba rezultātu atbilstība pamato OCC izmantošanu, lai semi-kvantitatīvi novērtētu S̄S atsevišķas govs pienā.



3. att./ Fig. 3. Somatisko šūnu skaita salīdzinājums, mērot ar tiešsaistes šūnu skaitītāju OCC un laboratorijas instrumentālo metodi/ The comparison of somatic cell count results measured by the online cell counter OCC and laboratory instrumental method

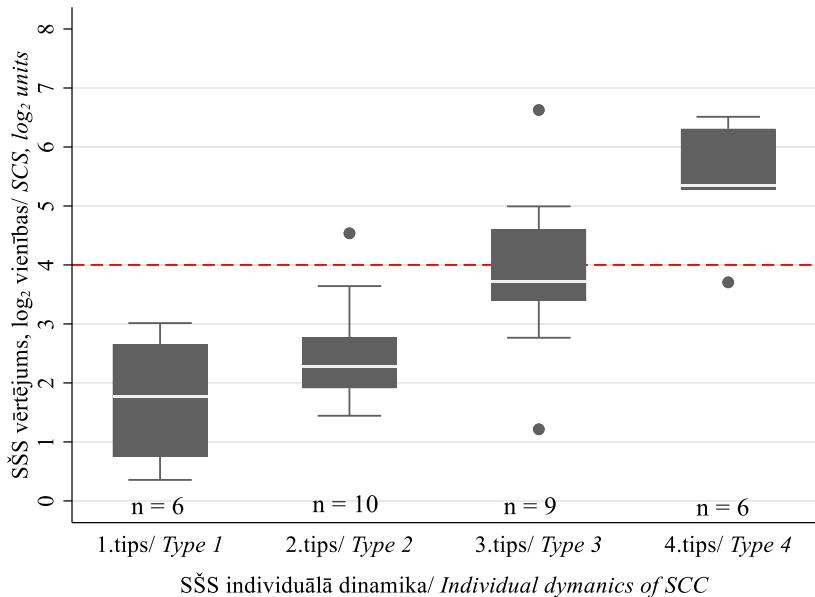
Savukārt mērījumu veikšana ar OCC katrā slaukšanas reizē veido kopējo priekšstatu par katras govs S̄SS līmeņa svārstībām. Pētījuma laikā katrai govi bija no 63 līdz 106 individuālām slaukšanas reizēm, vidēji 2.8 ± 0.3 reizes dienā. Katrā slaukšanas reizē ar OCC govi pienā noteica S̄SS. Visi četri S̄SS individuālās dinamikas tipi tika konstatēti gan MDi gadījumu grupā, gan kontroles govju grupā, tomēr katrā grupā bija atšķirīga šo tipu proporcija. Attēlā (4. att.) parādīta sakarība starp govs S̄SS individuālās dinamikas tipu, izvērtējot slaukšanas robotā noteiktos OCC sensora datus, un slaukšanas robotā aprēķināto mastīta noteikšanas indeksu MDi, respektīvi, pastāv nozīmīga atšķirība starp S̄SS individuālās dinamikas tipu sadalījumu govīm ar $MDi < 1.4$ un govīm ar $MDi \geq 1.4$ (4. att.). Tas liecina, ka 1. un 2. S̄SS individuālās dinamikas tips bija biežāk sastopams kontroles grupas govīm, bet 3. un 4. tips – gadījumu grupas govīm.

Attēlā (5. att.) parādīta sakarība starp govs S̄SS individuālās dinamikas tipu, izvērtējot slaukšanas robotā noteiktos OCC sensora datus, un piena pārraudzības somatisko šūnu skaita vērtējumu attiecīgajā mēnesī.



4. att./ Fig. 4. Govs SSS individuālās dinamikas tips atkarībā no slaukšanas
robota sistēmā aprēķinātās MDi vērtības saimniecībā S1/ Cow's individual
type of SCC dynamics depending on the MDi value calculated in the milking
robot system on the farm S1

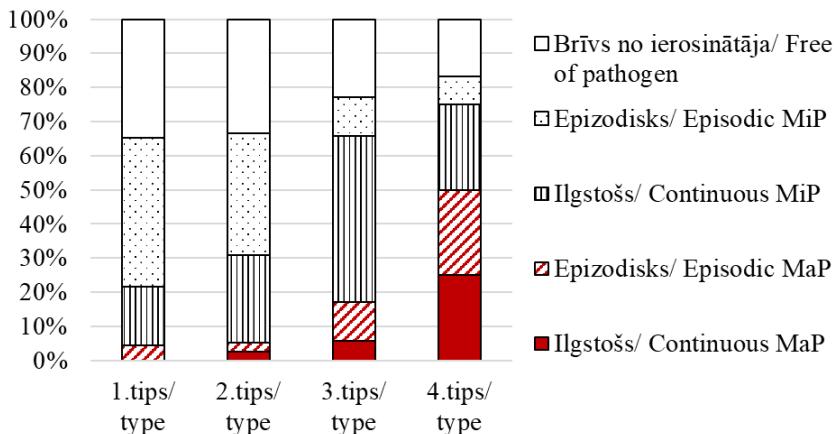
Kontroles grupa - govīs ($n=17$), kurām $MDi < 1.4$ / Control group – cows ($n=17$) with $MDi < 1.4$;
Gadījumu grupa - govīs ($n=14$), kurām $MDi \geq 1.4$ / Case group – cows ($n=14$) with $MDi \geq 1.4$.



5. att./ Fig. 5. Piena ikmēneša pārraudzības kontroles testa somatiško šūnu skaits govīm atkarībā no SSS individuālās dinamikas tipa/ Monthly officially recorded SCC depending on the cow's individual type of SCC dynamics

Salīdzinot ar govs tesmeņa ceturkšņu piena bakterioloģiskās izmeklēšanas rezultātiem, tika konstatēta individuālās dinamikas tipa atbilstība govs tesmeņa ceturkšņos konstatētā mastīta ierosinātāja grupai un klātbūtnes piena dziedzerī pastāvīgumam (6. att.). Jāatzīmē, ka SSS individuālās dinamikas 1.tipa un 2.tipa govīm tesmeņa ceturkšņu skaits, kuru pienā konstatē MaP, nepārsniedz 5% no visiem šo govju ceturkšņiem. Turklāt ilgstoša MaP klātbūtnē tika konstatēta vienā tesmeņa ceturksnī govij ar SSS individuālās dinamikas 2.tipu, bet 1.tipa govīm to nenovēroja vispār. Salīdzinot ilgstoša MiP klātbūtni tesmeņa ceturkšņu pienā, arī tā biežāk sastopama SSS individuālās dinamikas 2.tipa govīm, salīdzinājumā ar pirmo tipu. Turpretī epizodisks MiP biežāk konstatēts SSS individuālās dinamikas 1.tipa govju tesmeņa ceturkšņu pienā. Gan individuālās dinamikas 1.tipa, gan 2.tipa govīm vairāk nekā 30% no tesmeņa ceturkšņiem piena bakterioloģiskā uzsējumā nekādu mastītu ierosinātāju audzi neveidoja. Govīm ar trešo un ceturto SSS individuālās dinamikas tipu būtiski biežāk, salīdzinot ar 1. un 2.tipu, tesmeņa ceturkšņu pienā konstatēti MaP, kas, vērtējot kopā ilgstošas un epizodiskas klātbūtnes pienā gadījumus, ir novērota 50% no

visiem piena dziedzeriem. No visiem SSS individuālās dinamikas tipiem vislielākā ilgstoša MiP sastopamība ($>40\%$) raksturīga 3. dinamikas tipa govīm. Epizodiska MiP klātbūtne tesmeņa ceturķšņu pienā 3. un 4. tipa govīm ir novērota salīdzinoši reti, tikai līdz 10%.



6. att./ Fig. 6. **Mastīta ierosinātāji tesmeņa ceturķšņu pienā atkarībā no govs SSS individuālās dinamikas tipa/ Mastitis pathogens in udder quarter milk depending on the cow's individual type of SCC dynamics**

Kopumā, salīdzinot novērotās atšķirības starp četriem SSS individuālās dinamikas tipiem, mastīta ierosinātāju klātbūtnes loma virzienā no pirmā līdz ceturtajam SSS individuālās dinamikas tipam pieaug gan kvantitatīvi (skarto ceturķšņu īpatsvars), gan kvalitatīvi (epizodiska vai ilgstoša MaP klātbūtne).

Četri SSS individuālās dinamikas tipu relatīvā proporcija ietekmē visa ganāmpulka kopienā SSS un līdz ar to arī piena kvalitāti. Īpaši 4. tipa govju skaita attiecība pret 1. un 2. dinamikas tipa govju skaitu ir jāsaglabā pēc iespējas zemāka.

Mūsu pētījumā ir noskaidrots, ka 20 slaukšanas reižu laikā ar OCC iegūtie mērījumi labi iezīmē to, kāds ir aktuālais govs pienā novērojamais SSS individuālās dinamikas raksturs. Šādi posmi un daudzas slaukšanas reizes bez OCC mērījuma rezultātiem, apgrūtina SSS individuālās dinamikas vērtēšanu, jo arī govīm ar 4. tipu vairākās secīgās slaukšanas reizēs var būt SCS < 4 , jeb SSS < 200 tūkst. šūnas mL⁻¹.

Mastīta noteikšanas indeksa MDi efektivitāte

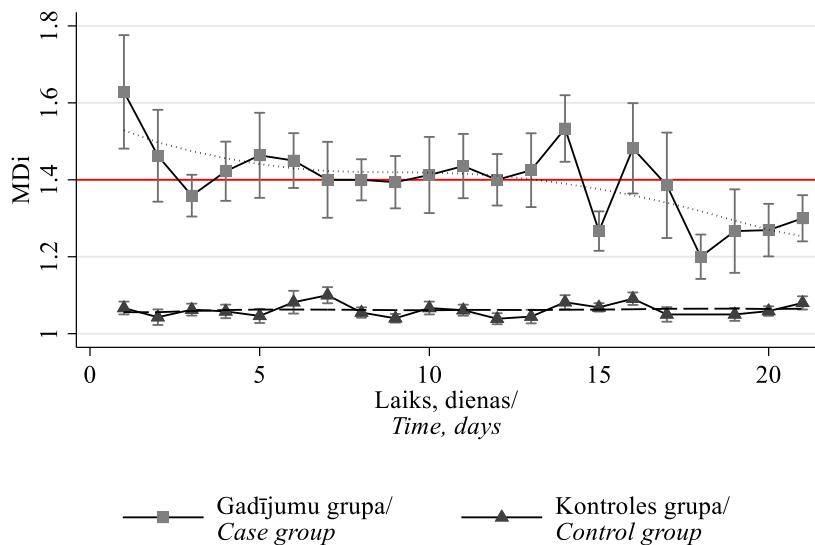
MDi rezultāti tika iegūti un salīdzināti 20 govīm kopskaitā no 522 slaukšanas reizēm 21 dienas laikā, kamēr kopējais slaukšanas reižu skaits bija 942 reizes, kā to apstiprina no slaukšanas robota sistēmas pilnā datu dublējuma kopijas par atbilstošo laika periodu. Katra gadījumu grupas govs tika slaukta vidēji 2.1 (0.71) reizes dienā, salīdzinot ar 2.4 (0.68) slaukšanas reizēm kontroles grupā. Klīniskais mastīts nevienai govij netika novērots. Govis no slaukšanas robotu grupas tika izraudzītas atkarībā no MDi vērtības. MDi rezultāti gadījumu grupā un kontroles grupā ir parādīti 7. att.

Vidējās MDi vērtības gadījumu grupā pastāvīgi bija augstākas nekā kontroles grupā. Trīs nedēļu periodā MDi līmenis gadījumu grupā pakāpeniski samazinājās (lineārās regresijas koeficients -0.01, $p < 0.05$).

Šajā pētījumā tika konstatēts, ka govīm ar augstāku MDi vērtību (gadījumu grupa) ir augstāks MaP epizodisko un zemāks bakterioloģiski negatīvas atraides īpatsvars nekā govīm ar zemu MDi vērtību (kontroles grupa). Attiecībā uz ilgstošu MiP un MaP, MDi vērtībās atšķirība neparādās.

Tāpēc šajā pētījumā, noskaidrojot MDi pielietojumu bakteriālu patogēnu izsekošanai, tika salīdzināti mastīta ierosinātāju grupējumi MaP un MiP kā subklīnisku iekaisumu cēlonis. Tai pašā laikā lielāka uzmanība tika pievērsta ierosinātāju mainībai, vērtējot epizodisku un nepārtrauktu ierosinātāja klātbūtni tesmeņa ceturkšņu piena paraugos. Tā kā ceturkšņi ar ilgstošu MaP klātbūtni veicināja vislielākā mērā SSS pieaugumu, tad šādām govīm būtu indicēta agrīna mastīta ārstēšana bez kavēšanās. Šajā sakarībā paaugstināts MDi, varētu būt svarīgs pirms signāla piena dziedzerī notiekošam infekcijas procesam, bet diemžēl pētījumā, savstarpēji salīdzinot uz MDi signāla pamata veidotās gadījumu un kontroles govju grupas, MaP infekcijas bija vienādi sadalītas starp grupām - 4 gadījumu grupā un 6 kontroles grupā (Table 7). Arī 74 tesmeņa ceturkšņi ar ilgstošu MiP, galvenokārt *Corynebacterium spp.*, sadalījumā starp gadījumu un kontroles grupām bija līdzīgā skaitā (Table 7). Ir zināms, ka līdz ar nepārtrauktu patogēna klātbūtni piena dziedzerī, palielinās bioplēves veidošanās risks, kas pasliktina izveselošanās prognozi, gadījumā, ja dotais ierosinātājs pēc zināma laika izraisa klīnisku mastītu. Baktēriju bioplēvju veidošanās uz epitēlijā virsmas piena dziedzerī samazina ārstēšanas efektivitāti un, govi neārstējot, attīstās hronisks mastīts, kas var kļūt par iemeslu govs izbrāķēšanai (Hordofa, 2022). Daži autori paaugstinātas MDi vērtības saista ar bioloģiskām izmaiņām tesmenī vai pat visā govs organismā (Forsbäck, Lindmark-Måansson et al., 2010).

Attiecībā uz elektrovadītspēju, tās vidējās vērtības gadījumu un kontroles grupām ir salīdzinātas tabulā (9. tabula).



7.att./ Fig. 7. Mastīta noteikšanas indeksa dinamika trīs nedēļu laikā gadījumu un kontroles grupas govīm/ Dynamics of the mastitis detection index over three weeks in case and control cows

9.tabula/ Table 9. Piena elektrovadītspēja govīm pētījuma grupās/ Electrical conductivity of milk in cows in study groups

Grupa/ The group	Sākuma MDi/ Initial MDi	Govju skaits/ Number of cows	Slaukšanas reizes/ Number of milking	Elektrovadītspēja/ Conductivity (SE), $\mu\text{S}/\text{cm}$	P- vērtība/ p-value
Gadījumu/ Case	≥ 1.4	10	437	4634 (22.5)	<0.05
Kontroles/ Control	<1.4	10	505	4562 (16.3)	
Kopā/ In total	-	20	942	4595 (13.6)	-

Govs tesmeņa līmenī piena elektrovadītspējas vidējā vērtība gadījumu grupā bija nozīmīgi augstāka nekā kontroles grupā (attiecīgi $4634 \pm 22.5 \mu\text{S cm}^{-1}$ un $4562 \pm 16.3 \mu\text{S cm}^{-1}$, $p < 0.05$). Tomēr abi rezultāti bija zem literatūrā norādītās piena elektrovadītspējas vidējās vērtības, kādu novēro veselām ($5300 \mu\text{S cm}^{-1}$) un subklīniski inficētām govīm ($5700 \mu\text{S cm}^{-1}$).

MDi robežvērtība nekvalitatīva piena novadišanai

Šajā pētījumā tika arī noskaidrots, kā MDi pielietojums atsevišķu govju piena novirzīšanai būtu saistīts ar ganāmpulka saražotā koppiena SSS. Kopumā gadījumu grupai ar augstu MDi bija ievērojami augstāks SCS, salīdzinot ar kontroles grupu (attiecīgi, 3.4 (0.48) pret 2.4 (0.46)). Arī atsevišķi dati par govīm liecināja, ka pētījuma laikā 60% gadījumu (12/20) augstāks MDi bija saistīts ar SSS virs 200 tūkst šūnas mL⁻¹. Tomēr kopumā MDi un SCS korelācija bija tikai viduvēja ($r = 0.37$, $p < 0.05$). To varētu izskaidrot ar to, ka atsevišķām govīm starp šiem diviem rādītājiem bija vērojama izteikta neatbilstība.

Lai raksturotu kopējo MDi efektivitāti tādu govju noteikšanai, kuru SSS pārsniedz 200 tūkst šūnas mL⁻¹ piena, aprēķināja Koena kappa koeficientu no 430 slaukšanas reizēm un konstatēja, ka sakritība ir zema ($\text{kappa} = 0.28 \pm 0.048$). Tas parāda, ka MDi un SSS izmaiņas nav paralēlas.

MDi robežvērtības neatbilstošas kvalitātes piena automātiskai noteikšanai modelēja, izmantojot MDi un svērto SSS, nemot vērā saražotā piena daudzumu. Tika noskaidrots, ka kopējais novirzītā piena daudzums pie MDi sliekšņa vērtības 2.0 būtu 102 kg jeb 2.3% no kopējā saražotā piena (4387 kg). Piena novirzīšana tiktu veikta 9 slaukšanas reizēs, un teorētiski aprēķinātā novirzītā piena SSS būtu 422 tūkst. šūnas mL⁻¹, un koppiena tvertnē nonākušā piena vidējais svērtais SSS būtu aptuveni 155 tūkst. šūnas mL⁻¹. No praktiskā viedokļa, neatbilstošas kvalitātes piena novirzīšana palīdz saglabāt kontroli par koppiena tvertnē uzkrātā piena SSS līmeni zem 300 tūkst. šūnas mL⁻¹. Jebkura zemāka robežvērtība, piemēram, 1.8, palielinātu novirzītā piena daudzumu līdz 265 kg (6% no visa saražotā piena) ar SSS 360 tūkst. šūnas mL⁻¹. Šādā gadījumā somatisko šūnu skaits ganāmpulka koppienā samazinātos līdz 148 tūkst. šūnas mL⁻¹, kam nebūtu praktiskas nozīmes salīdzinājumā ar 155 tūkst. šūnas mL⁻¹, pielietojot kvalitātes prasībām neatbilstoša piena novadišanai MDi sliekšņa vērtību 2.0.

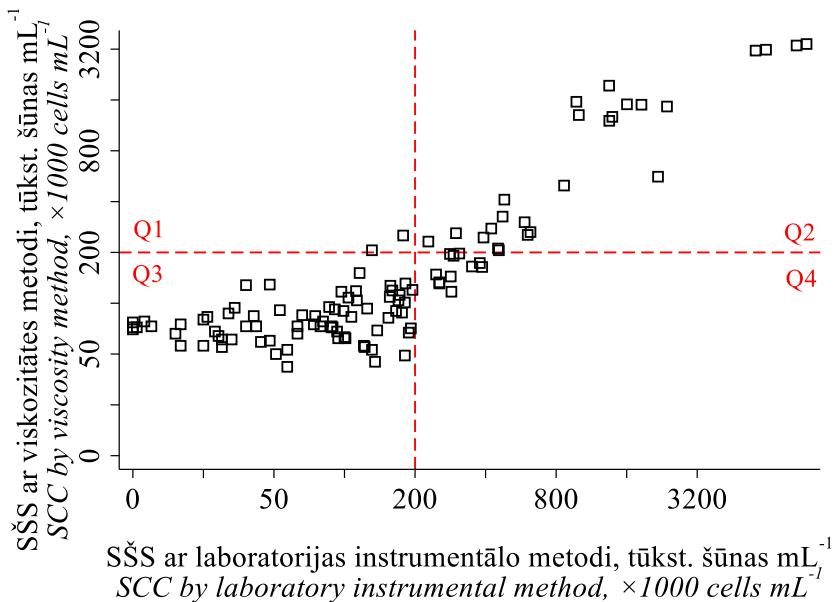
Mastīta noteikšanas indekss MDi (DeLaval, Zviedrija) primāri ir veidots, lai efektīgi atpazītu robotizētas slaukšanas procesā tos gadījumus, kad govij parādās klīnisks mastīts (Bausewein, Mansfeld et al., 2022). Tomēr kā liecina mūsu pētījuma rezultāti, MDi vērtību paaugstināšanās un pakāpeniska atgriešanās sākotnējā līmenī notiek arī subklīnisku tesmeņa veselības traucējumu gadījumā.

SSS sensora MQC-C2 efektivitāte

Somatisko šūnu skaita rezultāti, kas mērīti ar viskozitātes metodi, 111 govīm salīdzināti ar akreditētā laboratorijā instrumentālās metodes noteiktu SSS govs tesmeņa koppiena paraugā, kas iegūts tajā pašā slaukšanas reizē. Salīdzināmo SSS rezultātu kopā iekļauti arī SSS datī par katras govs iepriekšējām divām slaukšanas reizēm un turpmākajām piecām slaukšanas reizēm, kuras seko piena

pēc pārraudzības kontroles parauga noņemšanas. Par slaukšanas biežumu jāatzīmē, ka slaukšanas reižu skaits ganāmpulkā govīm 4 dienu periodā svārstījās no 5 līdz 21 reizēm un vidējais slaukšanas reižu skaits 24 stundu periodā bija 2.86 ± 0.07 reizes uz govi.

Attēlā (8. att.) parādīts ar viskozitātes metodi noteikta SŠS salīdzinājums ar rezultātu, kas ir iegūts pienu testējot ar laboratorijas instrumentālo metodi. Visi gadījumi, kuros tika konstatēta pretruna abu metožu starpā, ir robežās no 100 līdz 500 tūkst. šūnas mL^{-1} . Tātad, interpretējot SŠS, katras govs ar konstatētu SŠS vērtību šajā diapazonā būtu jāvērtē vēlreiz, sagaidot nākamajā slaukšanas reižē mērīto SŠS.



8. att./ Fig. 8. Govs SŠS rezultātu salīdzinājums, mērot ar viskozitātes metodi (MQC-C2 sensoru) un ar laboratorijas instrumentālo metodi vienā slaukšanas reižē/ The comparison of cows' SCC results obtained by the viscosity method (sensor MQC-C2) and the laboratory instrumental method at the same milking time

(dati: n=111govis, saimniecība S3/ the data: n=111 cows, herd S3)

Turpmākā viskozitātes metodes un laboratorijas instrumentālās metodes rezultātu sakritības analīze tika veikta, paplašinot laika intervālu un iekļaujot pētījuma grupas govju pārējās slaukšanas reizēs pirms un pēc pārraudzības

kontroles slaukšanas reizes mērītu viskozitātes SŠS. Jāatzīmē, ka to govju skaits, kuru SŠS > 200 tūkst. šūnas mL^{-1} , balstoties uz viskozitātes metodes mērījumiem, bija mazāks nekā redzams pēc laboratorijas instrumentālās metodes vērtējuma, jo kļūdaini negatīvo gadījumu skaits pārsniedza kļūdaini pozitīvo gadījumu skaitu visās slaukšanas reizēs (10. tabula).

10. tabula/ Table 10. Viskozi tātes metodes (VsM) pielietojums, lai atlasītu govis ar SŠS > 200 tūkst. šūnas mL^{-1} pēc laboratorijas instrumentālās metodes (LiM)/ Application of the viscosity method (VsM) to select cows with SCC $> 200\,000$ cells mL^{-1} according to laboratory instrumental method (LiM)

N ¹	Slaukšanas reizes ² / Milking times ²	Prevalence		Kļūdains vērtējums/ False assessment		Vispārējā sakritība/ Overall agreement	Koena kappa \pm SE ³ / Cohen's kappa \pm SE ³
		LiM	VsM	pozitīvs/ positive	negatīvs/ negative		
111	-2	32 %	24 %	3	12	87 %	0.67 \pm 0.09
110	-1	32 %	25 %	3	11	87 %	0.69 \pm 0.09
111	0	32 %	24 %	2	11	88 %	0.71 \pm 0.09
111	+1	32 %	23 %	1	12	88 %	0.71 \pm 0.09
110	+2	32 %	21 %	0	13	88 %	0.70 \pm 0.09
110	+3	33 %	24 %	3	13	85 %	0.64 \pm 0.09
107	+4	31 %	22 %	2	12	87 %	0.67 \pm 0.09
93	+5	31 %	24 %	2	9	88 %	0.70 \pm 0.10
111	-1 / 0	32 %	33 %	5	4	92 %	0.82 \pm 0.09
111	0 / +1	32 %	32 %	3	3	95 %	0.88 \pm 0.09
111	-1 / 0 / +1	32 %	32 %	4	5	92 %	0.81 \pm 0.09
111	-2/-1 / 0 / +1/+2	32 %	32 %	5	4	92 %	0.81 \pm 0.09

¹ N - govju skaits/ number of cows;

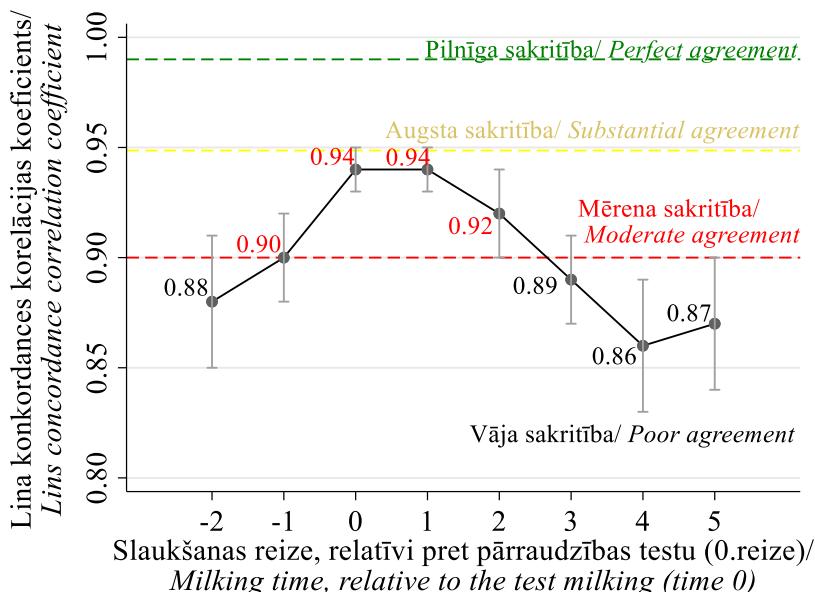
² Slaukšanas reizes norādītas relatīvi pret pārraudzības kontroles testa paraugu izmeklēšanu ar laboratorijas instrumentālo metodi (0. reize)/ Milking times are indicated relative to the milk recording control test milking when the milk was tested by laboratory instrumental method (zero time);

³ SE - standartķīuda/ standard error.

Ir redzams, ka pārraudzības kontroles testa slaukšanas reizē pastāv būtiska sakritība, bet tā nav ļoti augsta, jo koeficiente vērtība ir tikai 0.71 ± 0.09 . Slaukšana reizēs, pirms un pēc pārraudzības kontroles testa slaukšanas reizes, sakritības koeficients tikpat kā neizmainās. Tomēr apskatot vidējās viskozitātes SŠS vērtības no vairākām secīgām slaukšanas reizēm, Koena kappa vērtības pārsniedza 0.80, kas liecina par ļoti labu sakritību (Watson & Petrie, 2010). Lai

gan augstākā kappa vērtība 0.88 ± 0.09 tika novērota vidējai vērtībai, kas aprēķināta no diviem viskozitātes SŠS mērījumiem, t.i., pārraudzības kontroles testa slaukšanai (0) un sekojošai slaukšanas reizei (+1), līdzīgas precizitātes ($k > 0.80$) vidējo vērtību novēro arī 3 un 5 secīgās slaukšanas reizēs 0.81 ± 0.09 .

Arī Lina konkordances korelācijas koeficiente vērtība 0.94 pāraudzības kontroles testa slaukšanas laikā (9. att.) apstiprina tikai mērenu abu metožu kvantitatīvo sakritību. Slaukšanas reizēs pirms un pēc testa reizes korelācijas koeficiente vērtības vēl vairāk samazinās, kas apstiprina govju SŠS individualās svārstības un dinamikas vērtēšanas nozīmi.



9. att./ Fig. 9. Lina konkordances koeficients viskozitātes metodes rezultāta un laboratorijas instrumentālās metodes rezultātu savstarpējās atbilstības jeb korelācijas raksturošanai/ Lin's concordance coefficient for the characterization of compliance or correlation between the results obtained by viscosity method and the results of the laboratory instrumental method

Piezīme: Ar viskozitātes metodi mērījumi veikti katrā slaukšanas reizē, bet ar laboratorijas instrumentālo metodi tikai testa slaukšanas reizē, kas uz horizontālās ass norādīta ar nulli/ Note: By viscosity, measurements have been performed at each milking, but by laboratory instrumental method, only at the time of the test milking indicated by zero on the horizontal axis.

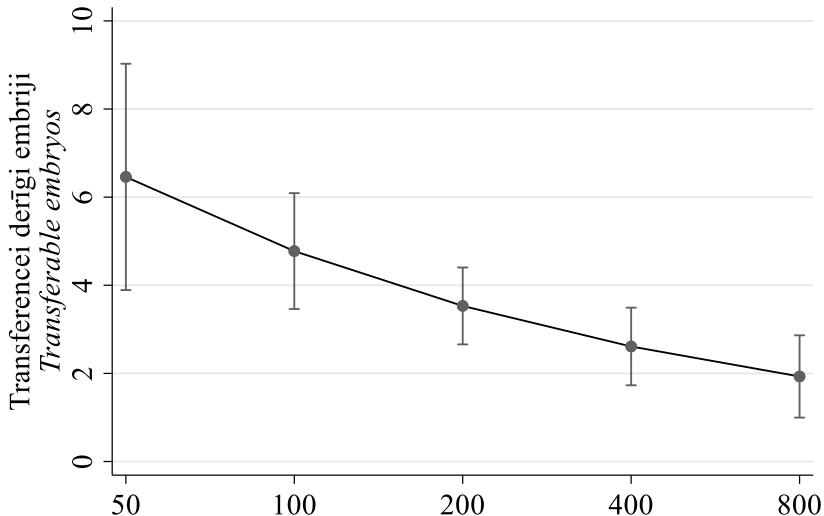
Mērot SŠS ar viskozitātes metodi katrā slaukšanas reizē, tiek novērota SŠS dinamika, ko neparāda vienreizējs mērījums ar laboratorijas instrumentālo

metodi. Tādējādi secinām, ka augsta somatisko šūnu skaita govju atrašanai viskozitātes metode jāizmanto pastāvīgi, lai vienmēr būtu iespēja aprēķināt vidējo rādītāju no divām secīgām slaukšanas reizēm. Jāpiemin, ka regulāri mērijumi ar viskozitātes metodi veido salīdzinoši zemas izmaksas.

Transferencei derīgu embriju ieguve atkarībā no donorgovju piena SŠS

MO inducēšanas un embriju ieguves laikā sekmīgu atbildes reakciju novēroja 24 no 30 donoriem (80%). Vidējais *corpus luteum* skaits (nCL) bija 7.7 (amplitūda no 1 līdz 19). Pavisam ieguva 151 embriju (nE), no kuriem 104 bija transferencei derīgi embriji (nTE). No diviem donoriem embrijus neiegua. Konstatēja, ka nCL vidēji cieši korelē ar nE ($r=0.65$; $p < 0.01$) un nTE ($r=0.57$; $p < 0.01$).

SŠS ietekme uz transferencei derīgo embriju skaitu ir parādīta attēlā (10. att.). Kopumā varam teikt, ka nTE analogiem donoriem ar atšķirīgu SŠS iepriekšējā mēnesī pirms MO indukcijas, embriju ieguve samazinās, pieaugot SŠS. Turklat ietekme uz nTE izpaužas ne tikai donorgovīm ar augstu SŠS, bet arī diapazonā SŠS<200 tūkst. šūnas mL⁻¹. Prognoze liecina, ka 6.5 transferencei derīgus embrijus iegūst, ja SŠS = 50 tūkst. šūnas mL⁻¹, bet 3.5 embrijus iegūst, ja SŠS = 200 tūkst. šūnas mL⁻¹, tātad vidēji samazinājums ir par 3 transferencei derīgiem embrijiem. Modelis nTE (11. tabula) parādīja nozīmīgu saistību ($p < 0.05$) tādiem faktoriem kā seruma Na⁺, absolūtais eozinofilo leikocītu skaits (Eo) MO indukcijas pirmajā dienā, vidējā diennakts gaisa temperatūra un SCS iepriekšējā mēnesī pirms embriju iegūšanas. Modelis nTE paredz arī transferencei derīgo embriju ieguves samazināšanos par 3.3 embrijiem, ja donorgovs SCS pieaug par IQR no 2.2 uz 4.6, bet pārējie mainīgie lielumi nemainās (apkārtējās vides gaisa temperatūra, Na⁺, Eo, un šķirne).



SČS iepriekšējā mēnesī pirms MO indukcijas un embriju ieguves/
SCC in the month preceding MO induction and embryo collection

10. att./ Fig. 10. Transferencei derīgu embriju skaita prognoze atkarībā no somatisko šūnu skaita donorgovs pienā/ *Predicted number of transferable embryos depending on the somatic cell count in donor cow's milk*

Attēlā parādīta marginālā prognozētā vidējā vērtība un 95% ticamības intervāls/ *The figure displays the marginal predicted mean and 95% confidence interval.*

11. tabula/ *Table 11. Donoru (n=23) rādītāju asociācija ar transferenci derīgo embriju skaitu (nTE)/Association of multi-variable predictors of the number of transferable embryos (nTE) from donors (n=23)*

Rādītāji/ Predictors	Vidējais/ Mean ± SE	$\beta^3 \pm \text{SE}$	P-vērtība/ <i>p-value</i>	Bāze/ Basis	Rādītāja vērtība/ <i>Predictor value</i>	Prognozētais nTE/ Estimated nTE	Ietekme/ Effect, ΔnTE
Dienmaks gaisa temperatūra ¹ / Daily air temperature ¹ (°C)	7.1 ± 1.32	-0.14 ± 0.06	0.016	IQR ⁴	2.2	11.1 ± 7.46	negatīva/ negative 6.4
SCS ¹ (log ₂ vienības/ log ₂ units) ⁵	3.8 ± 0.46	-0.30 ± 0.09	0.001	IQR	8.4	4.7 ± 1.62	
Nātrijs ² / Sodium ² (mmol L ⁻¹)	140.0 ± 0.4	-0.31 ± 0.08	<0.001	IQR	2.2	6.2 ± 1.38	negatīva/ negative 3.3
Eozinofīlie leikoцитi ² / Eosinophils ² ($\times 1000$ mm ⁻³)	0.7 ± 0.18	1.03 ± 0.24	<0.001	IQR	141	2.4 ± 0.45	negatīva/ negative 3.7
Regresijas vienādojuma konstante/ <i>The intercept</i>	...	46.0 ± 13.8	<0.001

¹ Iepriekšējā mēnesī pirms MO indukcijas un embriju iegavas/ *In the month preceding MO induction and embryo collection;*

² MO indukējas pirmajā dienā/ *On the first day of the multiple ovulation treatment;*

³ Negatīvās binomālās regresijas koeficients/ *Coefficient from negative-binomial regression;*

⁴ Stālpvardīlu attiecība/ *Interquartile range;*

⁵ Somatisko šķūnu skaita vērtējums log₂ vienībās/ *Somatic cell count score in log₂ units: SCS = 2 (50 000 mL⁻¹), SCS = 3 (100 000 mL⁻¹), SCS = 4 (200 000 mL⁻¹).*

Izvērtējot kopumā visus pētījumā iegūtos rezultātus un salīdzinot tos ar literatūras avotos citu autoru aprakstītajiem rezultātiem, var secināt, ka pētījuma izstrādes laiks un trīs unikāli pētījuma materiāla bloki, kas ir tematiski vienoti jautājumā par SSS vērtēšanas dažādo tehnisko risinājumu iespējām, apstiprina promocijas darba hipotēzi, jo parāda SSS rezultātu kompleksās vērtēšanas zinātnisko nozīmi un praktiskā pielietojuma aspektus govju tesmeņa veselības uzlabošanā un govju šķirņu saglabāšanā, kas ir svarīgi gan veterinārmedicīnās, gan lopkopības nozaru attīstībai un mijiedarbībai.

Pētījums parāda arī to, ka SSS nav tikai piena kvalitātes parametrs, bet arī govs veselības un reprodukcijas spēju netiešs indikators, kuram īpaši pieaug loma, piena ražošanas tehnoloģiskajos risinājumos cilvēka klātbūtni samazinot un arvien vairāk procesus, piemēram, slaukšanu, meklēšanās uzvedības novērošanu, aktivitātes vērtēšanu, aizstājot ar automatizētiem risinājumiem.

SECINĀJUMI

1. Subklīniska tesmeņa infekcija - ilgstoša MaP un MiP, kā arī epizodiska MaP klātbūtne tesmeņa ceturksnī - paaugstina SSS pienā, turpretī epizodiska MiP klātbūtne būtisku paaugstinājumu nerada.
2. Slaukšanas robota tiešaistes šūnu skaitītājs OCC, kas darbojas pēc fluoroptiskā principa, kā diagnostikas palīgierīce precīzi atpazīst govis, kurām ar laboratorijas instrumentālo metodi konstatē SSS > 200 tūkst. šūnas mL⁻¹ piena.
3. Govju robotizētās slaukšanas sistēmā pielietotā mastīta noteikšanas indeksa MDi vērtības tikai 60% govju atspoguļo SSS individuālo dinamiku, kā arī MDi efektivitāte piena SSS > 200 tūkst šūnas mL⁻¹ noteikšanai ir zema.
4. Ar MDi kā kritēriju neatbilstošas kvalitātes piena automātiskai novirzīšanai no kopējās piena plūsmas, robežvērtības MDi = 2.0 pielietošana nodrošina to, ka ganāmpulka kopienā SSS nepārsniedz 300 tūkst. šūnas mL⁻¹.
5. Ar viskozitātes sensoru MQC-C2 noteiktam vidējam SSS rādītājam no divām secīgām slaukšanas reizēm diagnostiskā precizitāte, lai atpazītu govis ar SSS > 200 tūkst. šūnas mL⁻¹, ir būtiski augstāka nekā vienam atsevišķam mēriņumam.
6. Embriju donorgovīm ar SSS > 200 tūkst šūnas mL⁻¹ vienu mēnesi pirms multiplās ovulācijas inducēšanas ir prognozējams transferencei derīgo embriju skaits samazinājums par vismaz 3 embrijiem, salīdzinot ar analogu donoru, kam SSS ir 50 tūkst. šūnas mL⁻¹.
7. Somatisko šūnu skaits ir ne vien mastīta diagnostikas un piena kvalitātes vērtēšanas parametrs, bet arī slaucamo govju tesmeņa aizsardzības un govs reprodukcijas spēju netiešs indikators, kura dinamikas izvērtēšanas

aktualitāte pieaug, automatizējot piena ražošanas tehnoloģiskos risinājumus.

IETEIKUMI PRAKSEI

1. Pielietojot saimniecībā tiešsaistes šūnu skaitītāju OCC, kas darbojas pēc fluoroptiskā principa, ir ieteicams vērtēt somatisko šūnu skaitu 20 secīgās slaukšanas reizēs, lai iegūtu priekšstatu par SŠS individuālās dinamikas tipu, kas var liecināt par subklīniskiem traucējumiem govs tesmenī un majorpatogēno mastīta ierosinātāju klātbūtni pienā.
2. Mērot govs piena SŠS ar sensoru MQC-C2, kas darbojas pēc viskozitātes principa, ieteicams mērījumus veikt katrā govs slaukšanas reizē, jo vidējā vērtība no divām secīgām slaukšanas reizēm precīzāk raksturo govs tesmeņa veselības stāvokli, nekā vienā slaukšanas reizē iegūts rezultāts.
3. Veicot donorgovju izvēli multiplai ovulācijai un embriju ieguvei, ir jāņem vērā potenciālo donoru SŠS un apkārtējās vides gaisa temperatūra vienu mēnesi pirms multiplās ovulācijas indukcijas un embriju iegūšanas.

INTRODUCTION

Independently of the milking system, milk somatic cell count (SCC) is an important indicator of the health of cows and the quality of milk (Gonzalo, Linage et al., 2006; Kamphuis, Dela Rue et al., 2013; Pyörälä, 2003; Schukken, Wilson et al., 2003). By automating technological solutions for milk production, after the transition to robotic milking, SCC evaluation, like recording of other health and activity parameters, takes on greater importance.

Various online sensor systems have been developed to check the compliance of milk from individual cows or a cow's udder quarter with the desired quality criteria (Kawasaki, Kawamura et al., 2008; Meilina, Kuroki et al., 2009). Milk sensors in the milking robot are designed to replace visual examination of the milk at each milking time, an important task for the milking person, to properly detect changes in the color and consistency of the milk that occur in cases of clinical mastitis or udder injury. Sensor measurement data are processed, and a derived parameter, the mastitis detection index (MDi), is calculated in the herd management system. This index indicates cows with udder health problems or changes in the composition of the milk. MDi can be used as a sorting criterion for automatically diverting sub-quality milk from the whole milk flow immediately during milking (Hovinen, Aisla et al., 2006; Hovinen & Pyörälä, 2011). The alarm report notes that a cow should be given more attention and should be tested by classic diagnostic methods - clinical examination and milk cytological and bacteriological investigation - to decide whether treatment of the cow is necessary.

Many models of the Automatic Milking System (AMS) can now be equipped with a somatic cell counting system that offers new opportunities for mastitis diagnostics. Therefore, information is needed on the accuracy of the new measurement methods and the practical application principles, as well as the estimation of potential benefits for improving milk quality and animal health. By clarifying the effectiveness of the online cell counter (OCC, DeLaval, Sweden) and indirect cell counter (MQC-C2, Lely, The Netherlands) built into the milking robot, it would be possible to accurately detect problematic animals for future herd health management and veterinary activities.

A bacterial pathogen plays a crucial role in the pathogenesis of mammary gland inflammation in dairy cows. In mastitis diagnostics, detecting a pathogen involves laboratory examination of an aseptically obtained milk sample to identify the presence of mastitis pathogens in milk, forming the basis for prevention, therapy, and prognosis. However, the design of the current milking robots is not well-suited to safely take aseptic milk samples from udder quarters for the bacteriological laboratory examination without additional cow fixation (Penry, 2018).

Since cows are milked several times a day, and robotic milking occurs at varying times each day, different principles are needed to determine the intramammary infection (IMI) status of the udder quarters. From a veterinary perspective, udder health sensors and udder alarm reports generated from processed signals serve to provide an objective basis for further veterinary decisions. Increases in both high SCC and milk electrical conductivity prompt two potential actions, depending on the magnitude of the changes in the indicators: immediate initiation of a full clinical examination of the cow, including milk sample collection from udder quarters for bacteriological testing, or observation of the cow's health with a follow-up of parameter changes to a repeated alarm at the next milking. If no repetition of the alarm occurs at the next milking, increased attention for the animal is no longer deemed necessary. Justifying an immediate bacteriological examination of the milk sample from the affected udder quarter based on a single measurement result is challenging because SCC may fluctuate and return to the previous level until the next milking after a short-term increase (De Vliegher, Ohnstad et al., 2018). Scientific research even suggests resampling and adhering to the so-called "gold standard" to validate certain IMIs in a given udder quarter.

If three milk samples from the same quarter were obtained weekly and tested for mastitis pathogens, only a pathogen found in at least two of three samplings could be confirmed as the IMI (Leitner, Blum et al., 2020). However, investigating three samples compared to one or two samples can be expensive, burdensome, or even impossible in many situations (Dohoo, Andersen et al., 2011).

When studying literature on SCC in cow's milk, it can be noticed that the causes of increased milk SCC may be due not only to abnormal processes in the udder but also in the reproductive system, the immune system, or other parts of the cow's body. Effects in the opposite direction, from the udder towards the reproductive system, also bind the interest of scientists. For instance, IMI and the associated toxins can disturb oocyte maturation (Asaf, Leitner et al., 2014), ovulation, conception, and embryo development (Soto, Natzke et al., 2003), as well as *corpus luteum* growth and impact the levels of sex hormones (Lavon, Ezra et al., 2011). While there is no doubt that subclinical mastitis has long-term effects on fertility, its negative effects on the animal's reproduction have been understudied and little documented (Wolfenson, Roth et al., 2019). Studies have shown the long-term disruptive effects of IMI on the functioning of follicles and ova (Furman, Leitner et al., 2014; Lavon, Leitner et al., 2011). Therefore, it was useful to include in the study topic the complex evaluation of SCC, a working task on how SCC is related to cow reproductive functions, and to clarify the impact of a donor cow's health indicators, including SCC, on the quantity and quality of produced embryos. It is under-documented how udder health

parameters such as high SCC affect multiple ovulation and embryo acquisition in local dairy cattle breeds at risk in Latvia, with a limited number of cows.

The theses to be defended are as follows: (1) Milk quality detection sensors installed in milking robots, designed to detect changes in the health of a cow's udder, often show contradictory assessments and therefore require improvements in the interpretation of the results. (2) Detecting mastitis pathogens in the foremilk from the cow's udder quarters, concurrently with measuring SCC, guarantees precise diagnosis of subclinical mastitis and serves as benchmark for evaluating the effectiveness of using milk electroconductivity-based sensors. (3) Repeatedly measuring the SCC during each milking session provides a clearer understanding of the persistent presence of mastitis pathogens in the mammary gland. (4) Mastitis diagnostics and the milk quality evaluation parameter of SCC might serve as indicators of a cow's fertility potential and as criteria for selecting embryo donor cows.

The hypothesis proposed in the thesis is that somatic cell count (SCC) serves not only as a parameter for mastitis diagnostics and milk quality evaluation but also as an indicative measure of udder defense and reproductive capacity in dairy cows. The assessment of SCC dynamics is increasingly significant with the automation of technical solutions in milk production.

The study aimed to examine how well the recorded cow udder health indicators from milking robot sensors could characterize the dynamics of SCC for detecting subclinical mastitis, as well as to explore the possible role of SCC in selecting embryo donors.

The objectives for the Doctoral thesis are as follows:

1. Examine how the episodic and continuous presence of both major and minor mastitis pathogens in the mammary gland impacts the rise in SCC in cases of subclinical intramammary infection.
2. Assess the accuracy of the fluoroptic online cell counter (OCC), integrated into the milking robot, to identify cows with $\text{SCC} > 200\,000 \text{ cells mL}^{-1}$ in real-world conditions on the dairy farm, and analyze the variability of OCC results across multiple milking sessions.
3. Evaluate the overall effectiveness of the mastitis detection index (MDi), used in bovine robotic milking systems, to identify cows with $\text{SCC} > 200\,000 \text{ cells mL}^{-1}$ and mastitis pathogens in milk, and compare MDi threshold values for the automatic diversion of sub-quality milk.
4. Evaluate the precision of measurements obtained from the viscosity-based SCC sensor MQC-C2, which is integrated into the milking robot, and assess its diagnostic agreement with the laboratory instrumental

- method in identifying the cows with $\text{SCC} > 200\,000 \text{ cells mL}^{-1}$ under practical conditions.
5. Evaluate the number of *corpus luteum* after multiple ovulation, the total number of embryos obtained, and the number of transferable embryos depending on the SCC in donor's milk, as well as evaluate the use of the SCC results in donor selection.

Scientific novelty of the research study included:

1. Development and testing of a novel categorization of the individual dynamics of SCC into four types, which reflect the potential presence of mastitis pathogens in cow's milk.
2. Identification of the capability of various milk quality sensors utilized in milking robots to identify cows with elevated an increased number of somatic cell counts exceeding $200\,000 \text{ cells mL}^{-1}$ during the milking process. The study employed real-world cow production data to model thresholds for the mastitis detection index (MDI), facilitating automatic detection and diversion of milk that does not meet quality standards.
3. Utilization of the milk quality sensor MDi for detecting subclinical intramammary infections (IMIs) demonstrating successful detection of episodic major pathogens (MaP). However, the study did not achieve successful detection of continuous subclinical IMIs, highlighting the need for further investigation in this area.
4. Utilization of the multiple regression method to assess diverse donor factors, such as SCC in cow's milk, which impacts the quantity of transferable embryos from *Latvian Blue*, *Latvian Brown*, and *Danish Red* breed donor cows. Consequently, practical recommendations were formulated to enhance the selection of embryo donors and streamline the process for optimization.

The Doctoral thesis work is summarized in 85 pages, including 19 Tables and 16 Figures.

It comprises eight chapters: introduction, literature review, material and methods, study results, discussion, seven conclusions, three recommendations, list of literature used (137 literature sources), and three annexes.

MATERIAL AND METHODOLOGY

Characterization of materials

The research activities with the dairy cows have been conducted in several phases to achieve the study objectives. Based on the progress of the study and variations in animal selection, the material is organized into three study blocks referred to as B1, B2, and B3.

The first study block, B1

The study was conducted at two dairy farms in Latvia. **The first farm, S1**, located in the Vidzeme region, utilizes the DeLaval automated cow milking system (VMS, DeLaval). Approximately 60 cows are housed in the robotic milking group at this farm. In addition to the milking robot, there is also a milking parlor where the remaining cows are milked. The composition of the milking robot group is periodically adjusted with high-milking cows being added and those with decreased milk yield being removed at the end of lactation. The milking robot station at farm S1 is equipped with a fluoroptic online cell counter (OCC) for measuring somatic cell counts. The cows at farm S1 are housed in a free-stall barn with reinforced concrete slatted floors, and the liquid fraction of manure is stored underneath. The cubicles are designed as deep boxes filled with sand, and chopped straw serves as litter material. The cows at farm S1 are fed a total mixed ration. **The second farm, S2**, located in the Zemgale region, also utilizes an automated DeLaval milking system (VMS, DeLaval). The robotic milking group at this farm consists of approximately 110 to 120 cows served by two milking robots. The cows at farm S2 are housed in a free-stall barn with shallow cubicles, where a rubber mattress covers the floor and a rubber mat covers the walkways. Manure is removed from the passageways by a scraper-type transporter in the barn.

At both farms, S1 and S2, udder preparation for milking is conducted automatically, with each teat being consecutively cleaned and milked. After the teat cups are automatically removed at the end of milking, and before the cow leaves the milking station, a spraying machine applies an iodine-containing disinfectant solution (Prima Plus, DeLaval, Sweden) to the tips of the teats and the lower surface of the udder for post-milking teat disinfection.

The SCC measured in cow's milk by OCC was compared with the fluorescent-opto-electronic laboratory instrumental method. To accomplish this, during one milking session in the S1 herd, a 40 mL portion of each cow's total udder milk was collected into a plastic container with a lid using the automatic milk sampler of the milking robot. The samples were preserved by dissolving a preservative BSM II (*Broad Spectrum Microtabs*) tablet. These preserved

samples were then sent to an accredited milk laboratory, where the SCC was measured using the automatic milk analyzer Fossomatic FC (FOSS, Hilleroed, Denmark) (according to LVS EN ISO 13366-2:2007 actual version).

To assess the dynamics of the mastitis detection Index (MDi) values in cows ($n = 20$) over a period of three weeks in the S1 herd in 2010, the current MDi readings displayed on the herd management system were recorded once daily at a specific hour. This was necessary because the previously calculated MDi values were not retained in the herd management system. Additionally, other relevant information, such as milking data, the number of milkings per day, milk electrical conductivity, and the possible presence of blood in milk, was obtained from a backup copy of the herd management system for the corresponding time period.

Cows with high MDi (case group G) and low MDi (control group K) were selected as cases and controls to evaluate the efficacy of MDi in detecting cows with high SCC and the impact of mastitis pathogens on milk SCC (see *Table 1*). The selection process occurred in October (S1, October 2009) and was repeated twice (S1, October 2010 and S2, October 2011). Each year, cows registered with $MDi \geq 1.4$ in the herd management system (“COW monitoring in VMS”, DeLaval International, Sweden) were initially chosen. These cows, with $MDi \geq 1.4$, comprised the udder health alarm case group ($n = 21$), forming matching pairs with control group animals ($n = 24$) randomly selected from cows with MDi values below 1.4. Pairs were matched based on parity (1st, 2nd, and 3rd or greater) and lactation phase (early 10–100, middle 101–200, late 201–305, and >305 days in milk). The composition of the case-control study groups is outlined in *Table 1*. Notably, cows from the early lactation phase were absent from the case group, thus preventing the formation of corresponding pairs. As a result, three cows with $MDi < 1.4$ represented the early lactation phase in the control group.

A comparison of cow yields between the case and control groups is presented in *Table 2*. Control cows, including three cows in early lactation, have fewer days between calving and the start of study. Additionally, control cows exhibit higher milk production and lower SCC levels compared to cows in the case group.

The assessment of individual SCC dynamics in cows is obtained by aggregating SCC data recorded by OCC at each milking time ($N = 1733$ milkings) over one month for both the case and control groups at the S1 farm ($n = 31$ cow). Additionally, each cow underwent bacteriological testing of quarter-milk samples twice during the assessment period of SCC dynamics to detect the presence of mastitis pathogens.

The study block B1 was conducted within the framework of grants 09.1447 and 09.1528 from the Latvian Council of Science, focusing on “Studies on the health of the udder of dairy cows and the quality of milk by applying milking robot technology”. All activities involving animals adhered to the requirements and ethical standards outlined in the applicable laws and regulations. Prior to

commencing work on the farm, verbal consent was obtained from the farm owner or manager to select a group of study cows and access comprehensive data from the herd management computer system, including creating backup copies of data, utilizing milk recording data, collecting quarter-milk samples during milking, and publishing study results. The farm owner was assured that obtaining milk samples during milking posed no risk to the welfare and health of the animals. The farm owner provided, for the time of milk sample collection, a competent person familiar with the organization of the automatic milking system (AMS) cow flow so that the other cows in the group were not negatively affected.

During the study period, from October 2009 to October 2011, the Animal Protection Law (with amendments and additions effective from January 1, 2000) and Cabinet Regulations titled “Procedures for keeping, using, marketing and killing animals used for experimental and scientific purposes” No. 450 (issued on October 23, 2001: Prot. No. 52-11.), along with the subsequent Cabinet Regulations “Regulations regarding registration of breeders, suppliers and users of experimental animals, procedures for performing activities with experimental animals, and welfare requirements to be ensured for experimental animals” No. 1131 (issued on December 21, 2010: Prot. 74-45), did not mandate special permissions for the study. This study did not involve experimental procedures outside of standard farm production practices and therefore, did not require additional permits (Cabinet of Ministers of the Republic of Latvia, 2001, 2010; Saeima of the Republic of Latvia, 2000). The LBTU Internal Council on Animal Welfare and Defense Ethics was established subsequently on March 30, 2015, through the rector's order No 4.3-13/29.

The second study block, B2

To evaluate the accuracy of the viscosity-based SCC sensor of the milking robot in practical conditions, the study was conducted on farm S3, housing 120 dairy cows and equipped with two automated milking stations (Astronaut A4, Lely, The Netherlands) fitted with MQC-C2 sensors for SCC determination in the cow's udder milk. This involved assessing the entire quantity of milk obtained from each cow during a single milking operation. SCC data based on viscosity measurement were collected for most cows ($n = 111$) from the milking robot's management system, covering eight consecutive milkings per cow. During the third milking, a milk sample of 40 mL was extracted using the milk sampler in the milking robot, poured into a plastic container with a lid, and preserved with a BSM II (*Broad Spectrum Microtabs*) tablet. These preserved samples were then sent to an accredited milk laboratory for SCC measurement using the automatic milk analyzer Fossomatic FC (FOSS, Hilleroed, Denmark) (LVS EN ISO 13366-2:2007 current version). Nine cows with less than seven days after calving were excluded from the SCC comparison analysis.

No procedures were conducted on animals in study block B2, and the cows' daily living routines remained unchanged. Following the Cabinet regulations effective during the study period, specifically "Regulations regarding Protection of animals used for Scientific purposes" No. 52 (issued on January 22, 2013: Prot. No. 5-25), in such cases, authorization and opinion from the Council of Animal Welfare and Defence Ethics of the Food and Veterinary Service are not required to initiate the study. This exemption is applicable to practical activities that do not induce pain, suffering, discomfort, or lasting harm equivalent to at least the administration of a needle in accordance with good veterinary medical practice (Cabinet Regulation No. 52, Paragraph 5.6) (Cabinet of the Republic of Latvia, 2013).

The third study block, B3

The study block B3 was carried out at 16 dairy farms over the territory of Latvia. Donor-associated factors, including the SCC in milk, have been compared and evaluated for relation to multiple ovulation (MO) and embryo acquisition in 7 Latvian Blue (LZ), 13 Latvian Brown (LB), and 10 Danish Red (DS) donors, total n = 30 (2 heifers (no data on SCC), seven primiparous, and 21 multiparous cows) (*Table 3*). During the study, the donors, 1 to 8 cows per farm, were on their farms.

For donor cows, the average lactation number (SE) was 3.6 (2.4) lactations. Two donors were heifers, aged 1.7 (0.14) years, and 28 donors were cows, consisting of 7 primiparous cows aged 2.6 (0.1) years and 21 multiparous cows aged 7.2 (0.7) years. As depicted in *Table 3*, 17 donors (60.7%) were older than five years. The donor's median body condition when initiating multiple ovulation (MO) induction was 2.7 (0.6) BCS points. The characteristics of productivity and milk quality of the donors in the month preceding MO induction were: milk yield 18.1 (1.4) kg day⁻¹, milkfat 4.6 (0.2) %, milk protein 3.8 (0.1) % and SCC 165 (17) thousand cells mL⁻¹.

Study block B3 was conducted as part of the ERDF project titled "Conservation of genetic resources of bovine animals in Latvia by application of embryo transference and associated biotechnologies" (Nr. 1.1.1.116A025, 2017-2020). All protocols and procedures involving bovine animals within the project's scope were assessed and approved by the Council of Animal Welfare and Defence Ethics of Latvian Agricultural University (opinion No. 172 from June 22, 2017).

Description of the methods used in the study

Collection of milk samples from the cows` udder quarters (B1)

In study block B1, samples of cow udder quarter's foremilk for the determination of SCC, milk composition, and bacteriological examination were collected twice, with a 10 to 14-day interval. Throughout the study, a total of 352 foremilk samples from 45 cows were utilized to determine SCC and milk composition, while an additional 352 aseptically obtained udder quarter's foremilk samples were collected and analyzed for the presence of mastitis pathogens. During milking, foremilk samples were collected at an AMS workstation after cleaning cow teats and milking the first milk jets. The milking robot was temporarily paused during sampling. Initially, milk for SCC and milk composition analysis (fat %, protein %, lactose %, and urea content in mg dL⁻¹) was manually sampled from each teat into labeled plastic containers containing a preservative BSM II tablet. Subsequently, the teat ends were disinfected with a cotton gauze wipe impregnated with a 70% ethyl-alcohol solution. The milk was aseptically sampled in four sterile glass tubes for bacteriological testing. The tube was opened just before milk sampling, and the milk jet was directed horizontally towards the tube opening when approaching the teat tip. After sampling, the tube was immediately sealed with a rubber cork and cooled in a cold-water bath (+5 °C). All milk tubes were simultaneously removed from the water, wiped dry, and placed in a cooling box with ice elements. Within 12 hours, samples for bacteriological examination were transported to the Faculty of Veterinary Medicine, Clinical Institute's Herd Health and Reproduction Problems Laboratory in Jelgava, where analysis commenced immediately. Within the subsequent 72 hours, samples were delivered to the laboratory for SCC and milk composition analysis using laboratory instrumental methods (SIA "Piensaimnieku laboratorija", Ulbroka). The threshold value of 100 000 cells mL⁻¹ corresponding to SCS = 3.0 log₂ units shall be used in this work to evaluate the results of the SCC in the udder quarter's foremilk.

Testing of udder pathogens in milk (B1)

Samples of cow udder quarter's foremilk were cultured at 37 °C on Colombia blood agar media (Biolife, Monza, Italy) supplemented with 5 % cow blood. The investigation and classification of isolates followed the methodology outlined in the "Laboratory and Field Handbook on Bovine Mastitis" of the US National Mastitis Council (NMC) (National Mastitis Council, 1987, 2017). The milk sample was streaked onto the medium using a disposable plastic bacteriological loop (0.01 mL). Inoculated plates were then incubated, and bacteriological growth was assessed after 24 and 48 hours. Bacterial smears were prepared from

grown colonies, stained with Gram colors (Benex Limited, Dublin, Ireland), and evaluated. Additionally, the isolates were subjected to catalase and oxidase tests, and streaked onto differential media. Identification of mastitis pathogens was carried out at group, genus, and species levels using mannitol-salt agar (Oxoid Limited, Altringham, UK), bile-esculin agar (Benex Limited, Dublin, Ireland), and MacConkey agar N2 (Biolife, Tortona, Italy). *Staphylococcus aureus* (coagulase-positive staphylococcus) was confirmed using a rabbit plasma test with tubes containing 0.5 mL rabbit plasma (BeNex Limited, Dublin, Ireland), while *Streptococcus agalactiae* was confirmed using the CAMP test. *Streptococcus uberis* (esculin-positive streptococci) was characterized by esculin hydrolysis around the inoculation line of the medium and lack of visible colonies on the bile-esculin agar. Gram-negative bacteria, including *Escherichia coli*, were identified on MacConkey agar N2. Other pathogens were classified at the genus level, including coagulase-negative staphylococcus (KNS) or *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., and *Corynebacterium* spp.. The presence of a single colony in primary culture was considered significant only if no other colonies were present on the blood agar media (National Mastitis Council, 2017).

Major mastitis pathogens (MaP) include *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, esculin-positive streptococci, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., other coliforms, *Enterococcus* spp., *Trueperella pyogenes*, *Pasteurella* spp., and *Pseudomonas* spp.. Coagulase-negative staphylococci and corynebacteria are considered minor mastitis pathogens (MiP) (Dingwell, Leslie et al., 2003; Piepers, Opsomer et al., 2010). If both MaP and MiP are present in the udder quarter's foremilk simultaneously or in one of the two milk sampling times, the quarter shall be recognized in the aggregate assessment as affected by the MaP. Isolation of the same agent from milk is designated as a **continuous MaP** or **continuous MiP**, both during the first and second milk sampling. The appearance of the pathogen was defined as the detection of bacteria in milk at the second sampling time but not at the first sampling time. **Episodic MaP** was defined as the detection of a MaP only at the first or second milk sampling time, while at the other sampling time, a different mastitis -associated pathogen MiP was isolated or no pathogen was found. Conversely, an **episodic MiP** was defined as detection of a MiP at the first or second sampling time, but at the other sampling time, the presence of another MiP or no pathogen was found (see *Table 4*).

Cows that test negative for pathogens in milk from all quarters of the udder shall be classified as having a "pathogen-free status". Cows in which the same pathogen is detected in the milk of one or more quarters of the udder shall be classified as having a "status with one pathogen". Cows for which different intramammary infections (IMIs) are detected in the foremilk of different quarters of the udder shall be classified as having a "multiple pathogen status". If both

MaP and MiP are detected simultaneously in the same animal, the cow is classified as being affected by MaP.

Determination of the cow udder foremilk composition (B1)

Samples of cow udder quarter's foremilk for the determining the SCC by laboratory instrumental method and milk composition were collected directly from the cow teats into 40 ml plastic containers with lids and immediately preserved with 0.02% 2-brom-2-nitropropane-1,3-diole (BronopolTM) or BSM II tablet. These samples were then delivered and analyzed at an accredited laboratory (SIA "Piensaimnieku laboratorija", Ulbroka, Latvia) within 72 hours.

The SCC was measured by laboratory instrumental fluorescence-electronic cell flow cytometry for raw milk using an automatic milk analyzer Fossomatic FC (FOSS, Hilleroed, Denmark) (LVS EN ISO 13366-2:2007 actual version).

The fat %, protein %, and lactose % content were determined by laboratory instrumental mid-infrared spectrophotometry using a high-throughput fully automatic analyzer MilkoScan FT 6000 (FTIR, FOSS, Hilleroed, Denmark) according to ISO standard (ISO9622/IDF141:2013 actual version). Urea concentration in milk (mg dL^{-1}) was determined by the laboratory-validated method MET-003.

Milk recording data (B1, B2, B3)

For each cow included in the study, milk recording data were obtained from the cow pedigree cards of the Agricultural Data Center of Latvia. In study block B1, the dataset was supplemented by the cow's milk yield, SCC, fat %, protein %, and lactose % recorded under the milk recording in September and October of the year concerned. In study block B2, the dataset was supplemented by SCC data for the given month. In study block B3, the dataset was supplemented with the milk recording data about the cow's milk yield, SCC, fat %, protein %, and lactose % content for the current month when induction of the multiple ovulation was started, as well as the data recorded one month previously for the same parameters.

Acquisition of data from milking robot sensors via the herd management system (B1; B2)

The research in study block B1 was conducted on two dairy farms equipped with the same automated milking system (VMS, DeLaval, Sweden). Milk yield data, as well as measurements of the electrical conductivity of milk, were recorded during each cow's milking for each udder quarter. Additionally, the

length of milking intervals and OCC results were recorded (S1) for each cow, along with the number of milking times per day. All data for a three-week period, except MDi data, were collected from the milking robot computer files in the herd management system and obtained from a complete backup copy of the system data. MDi dynamics were studied in October 2010. Data had to be collected once a day, saving screenshots of the herd management system display because MDi updated at every milking, and previous values were not stored in the system.

During study block B2, an on-site report was generated at farm S3 on SCC measurements using the viscosity method, cow identification number, and milking time. The full report was retained from the computers of milking robots (Astronaut A4, Lely, Netherlands) after five milking times passed for all cows since milk recording.

General clinical and gynecological examination of donors (B3)

A history of each donor cow (anamnesis) was obtained since the last calving. General clinical and gynecological investigations were conducted before initiating multiple ovulation (MO) induction. Only cows deemed practically healthy, with no gynecological diseases detected by rectal examination or uterine and ovarian ultrasonography, were selected for MO induction. Before initiating MO induction, two normal-length estrus cycles were observed in each cow. The body condition of the cows was assessed on a 5-point BCS scale with steps of 0.25 (Ferguson, Galligan et al., 1994). MO induction was initiated if the donor cow's body condition ranged from 1.50 to 4.50 points. Express-testing of blood β -hydroxybutyrate (BHB) concentration was performed in all cows before MO induction using the Free Style Optium Neo kit from Abbot Laboratories Ltd, UK. Cows with BHB levels exceeding 1.2 mmol L^{-1} were excluded from the study.

Biochemical, hematological, and hormone parameter testing in the blood of donors (B3)

Blood samples for serum biochemical parameters, hematological parameters, and progesterone (P4) concentration were collected from all donor cows on the day of MO induction. Subsequent blood samples for P4 had been obtained prior to PGF 2α injection, at the first artificial insemination (AI), at the second AI, and on the day of embryo flushing. Blood samples were taken in 7 mL vacutainers (HumaTube Serum C/A (z), Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH, Germany) by punctuating *vena caudalis lateralis superficialis*. Samples were put into a portable electronic cooler (Model CNG01-B, Tortona Alexandria, Italy) with ice elements at a temperature not exceeding

four °C for 4 to 8 h. The samples were centrifuged at 1500 rpm for 12 min to remove sera. The samples were delivered to the laboratory immediately to carry out serum biochemistry. Sera were stored at -20 °C until analysis to establish P4 concentration. The following metabolites and electrolytes were analyzed in sera: total protein (TP), albumin, urea, creatinine (CREA), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), lactate dehydrogenase (LDH), gamma glutamyl-transferase (GGT), cholesterol (CHOL), triglycerides (TRG), calcium (Ca), magnesium (Mg), phosphorus (P), potassium (K), sodium (Na), and chloride (Cl). The analyses were performed in an accredited laboratory, SIA "Centrala Laboratorija".

Serum P4 concentration was analyzed in the Institute of Food Safety, Animal Health and Environment 'BIOR' accredited laboratory using VIDAS® Progesterone enzyme-linked fluorescent immunoassay (Biomerieux SA, RCS Lyon, France). The coefficients of inter- and intra-assay variation were <5%. The measurement range of the P4 assay was from 0.80 nmol L⁻¹ to 254.40 nmol L⁻¹. Samples with P4 concentrations >254.4 nmol L⁻¹ were diluted by half and reanalyzed.

Reference values were adapted from Duncan and Prasse's Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology and Clinical Biochemistry of Domestic Animals (Kaneko, Harvey et al., 2008; Latimer, 2011).

Multiple ovulation treatment, embryo collection, and evaluation (B3)

All cows in study block B3 were exposed to multiple ovulation (MO) once, not earlier than 80 days after cow calving. All cows were presynchronised with two injections of prostaglandin F2 alpha (PGF2α) analogue cloprostetol (Oestrophan; Bioveta, Czech Republic) at a dose of 500 µg intramuscularly (*im*) 14 days apart. Between day nine and day 12 of the estrus cycle, MO induction was initiated in cows following two standardized superovulation protocols (Hasler et al., 1983).

Corpus luteum luteolysis was initiated with PGF2α at a dose of 500 µg *im* 48 h after ECG (equine chorion gonadotropine, first protocol) or at the same time as pFSH 6th injection (porcine follicle-stimulating hormone, second protocol). The cow was artificially inseminated (AI) two times in 48 h and 60 h after injection of PGF2 α, but if the cow continued to show signs of estrus, 12 h later, one more AI was done.

The number of *corpus luteum* in a donor's ovaries was determined on the day of embryo flushing, the seventh day after the first AI, using an ultrasonographic scanner with a linear 5 MHz intrarectal probe. To prevent tenesmus, 100 mg procaine hydrochloride was used epidurally (5 mL Procavidor 20 mg mL⁻¹, Richter Pharma AG, Austria). A 2-way silicon ET catheter connected with a Y-junction tubing and embryo collection filter system was used for a non-surgical

embryo recovery. Each uterine horn was flushed with BoviFlusch Recovery Medium (Minitüb GmbH, Germany) using continuous flow until 500 mL and filtered through an embryo filter EmGuard System for Embryo Collection Bovine/Equine (Minitüb GmbH, Germany). The filter system with recovered material was carried to a separate clean room. After disconnecting the filter from the filter dish, it was flushed, and the fluid was transferred to Petri dishes. The fluids in the filter dish and Petri dishes were searched under a stereomicroscope (Nikon, Japan) to find embryos at a magnification of 10 times. All discovered embryos were carried over into smaller Petri dishes containing 5 mL of BoviHold medium (Minitube GmbH, Germany), maintained at ambient temperature, evaluated, and classified under 100 times magnification. Embryos were classified morphologically as unfertilized oocyte (Stage code 1), a one-cell embryo (Stage code 2), morula (Stage code 3), compact morula (Stage code 4), early blastocyst (Stage code 5), blastocyst (Stage code 6), expanded blastocyst (Stage code 7), and hatched blastocyst (Stage code 8). The embryo quality was graded (Grade 1 = excellent, Grade 2 = good, Grade 3 = fair, Grade 4 = poor, and Grade 5 = degenerate) as described Bó and Mapletoft (2013). The total number of embryos (nE) was obtained by summing up embryos of all stage codes and all quality grades, including degenerated ones. The number of transferable embryos (nTE) corresponds to all embryos with quality Grades from 1 to 3 that are considered acceptable for the direct transfer into recipient cattle (Bó & Mapletoft, 2013).

Four days after embryo flushing, donor cows received *im* injection of PGF2 α to induce luteolysis and return them to normal cyclicity (Viana, Vargas et al., 2016).

Determination of each cow's individual type of SCC dynamics (B1)

By summarizing the OCC measurement results obtained by the automated milking system at each milking time and displaying them graphically, the fluctuations in SCC in each cow reveal distinct trends described in this study as four types of individual dynamics of the SCC. Depending on the level of the SCC and the positioning of somatic cell score (SCS) points relative to a threshold value of SCS = 4, corresponding to $SCC = 200\ 000\ cells\ mL^{-1}$, the cows were categorized into four types of individual SCC dynamics (see *Table 5*). The time axis in the examples of individual SCC dynamics shown in the table is divided with vertical lines into sections of 20 milkings. Although not all milking times have been measured with OCC, a period of 20 milkings serves as the minimum duration for comparing oscillations in OCC results to assess the type of individual SCC dynamics for each cow.

Statistical data processing

To assess the dynamics of the SCC of individual cows, the OCC determined SCC data was collected in a herd management system and obtained from the backup files of the milking robot for each milking time within one month. For the SCC results to match the normality assumption, the SCC was converted to somatic cell count score (SCS) standardized \log_2 units by formula (1), or in cows with low SCC $\leq 12\ 000$ cells mL^{-1} to SCS = 0. After conversion, the SCC threshold value of 200 000 cells mL^{-1} corresponds to SCS = 4.0 \log_2 units (Shook, 1993).

$$SCS = \log_2(SCC \times 10^{-5}) + 3 \quad (1)$$

SCS – somatic cell score, \log_2 units;
SCC –somatic cell count, cells mL^{-1} .

To characterize the effectiveness of the viscosity method for the identification of cows with an SCC $> 200\ 000$ cells mL^{-1} in milk by laboratory instrumental method, the overall level of agreement in the results obtained from both methods was assessed by calculating Cohen's Kappa coefficient (k). Cohen's Kappa coefficient interpretation was done on the Landis and Koch scale (Landis & Koch, 1977): poor agreement $k \leq 0.20$; fair agreement $0.21 \leq k \leq 0.40$; moderate agreement $0.41 \leq k \leq 0.60$; substantial agreement $0.61 < k \leq 0.80$; good agreement $k > 0.80$.

The frequency of false positive and false negative ratings was also calculated for the results obtained.

To characterize the quantitative agreement between the viscosity method SCC and the laboratory instrumental method results, Lin's concordance correlation coefficient was calculated for all milkings. These coefficient values were compared individually, as well as the averages from two, three, and five milking times surrounding the milk recording test. The calculations were performed using the extension of the Stata software developed by Steichen and Cox (Steichen & Cox, 2002). Lin's concordance correlation coefficient interpretation was done on McBride scale (Lin, McBride et al., 2005): poor agreement $r < 0.90$; moderate agreement $0.90 \leq r \leq 0.95$; substantial agreement $0.95 < r \leq 0.99$; almost perfect agreement $r > 0.99$.

The agreement between the SCC determined by the viscosity method and the laboratory instrumental method on the day of milk recording control was graphically assessed using the Bland-Altman diagram (Watson & Petrie, 2010).

MDi dynamics were compared using the variance analysis ANOVA method for repeated measurements. Throughout the study, differences between groups were considered significant if $p < 0.05$.

The appearance of a mastitis pathogen, i.e., not detected at first sampling but detected at second sampling, was analyzed by multiple logistic regression analysis using the Stata software (*StataCorp LP, 4905 Lakeway Drive, College Station TX77845, USA, version Stata BE 17.0 for Windows*).

The Pearson Chi-square test has been used to compare the distribution of the mastitis pathogens between case and control groups. Fisher's exact test has been used to evaluate differences between smaller subgroups ($n \leq 5$).

Multiple ovulation (MO) success, or response to MO induction, was evaluated by *corpus luteum* counts (nCL) on the day the embryo flushing. Response to MO induction was considered successful if $nCL \geq 3$.

A multiple negative binomial regression model (MNBR) was used to statistically assess the relationship between nCL (nCL model) and serum biochemical parameters, milk SCC and cow yield, lactation number, and ambient air temperature before MO induction. The breed of cow was automatically included in the model as a potential confounding factor regardless of its level of statistical significance. Similarly, the MNBR method has been used in interpreting the potentially influencing factors of nE and nTE, model nE and model nTE, respectively: progesterone (P4), 17 β -estradiol (E2) levels, blood biochemical parameters, hematological parameters, body condition (BCS), lactation count, ambient air temperature, milk SCC, milk yield, milk fat %, and milk protein % content (Dohoo, Martin et al., 2010).

Description of the progress of the study

Throughout the study (*Table 6*), the somatic cell count in cow's milk has been analyzed as an indicator of successful cow udder function, quality milk production, and beneficial effects on a cow's reproductive system capacity, especially during multiple ovulation and production of transferable embryos.

During this research study, there was a unique opportunity to investigate cows belonging to the category of genetic resource breeds at risk. These cows were housed on many farms across the country, and it is understandable that they were not included in the milking robot system during the study. Study block B3 was important for testing the hypothesis that better reproduction results are expected in cows with lower somatic cell counts in milk and healthier udders. The timing of the study and the three distinct blocks of study material, which are thematically unified on the feasibility of different technical options for evaluating SCC, are necessary to demonstrate the scientific importance and practical application of the complex evaluation of SCC results for improving udder health and maintaining reproductive efficiency in endangered cow breeds.

RESEARCH RESULTS AND DISCUSSION

Milk SCC depending on the presence of the mastitis pathogens and MDi

The data set of the study block B1 consists of the results of repeated bacteriological examination of the udder quarter's foremilk for the presence of major mastitis pathogens and minor mastitis pathogens, milk composition (milk fat %, protein %, lactose %, urea concentration) and somatic cell count (SCC) in 45 cows from two herds.

Udder quarters were classified based on the IMI status, determined by interpreting bacteriological investigation results. Three categories were distinguished regarding the presence of mastitis pathogens: continuous presence in milk (pathogen isolated repeatedly during both milk samplings), episodic presence (pathogen isolated only once), and absence of the pathogen (no pathogen detected at milk sampling). Major mastitis pathogens (MaP) identified in this study include coagulase-positive staphylococci, esculine-positive streptococci, and *Enterococcus spp.*, while minor mastitis pathogens (MiP) consisted of coagulase-negative staphylococci and *Corynebacterium spp.*. It is noteworthy that some cases revealed mixed infections or pathogen replacement within a 10 to 14-day period.

A total of 176 udder quarters in 45 cows have been evaluated for the presence of MiP and MaP (all four mammary glands functioned in 41 cows, while only three mammary glands functioned in four cows).

Out of all udder quarters (*Table 7*) in both investigations, ten quarters (5.7%) showed a continuous MaP presence, and 74 (42.0%) quarters had a continuous MiP presence. Thus, the continuous presence of mastitis pathogens was confirmed in 47.7% of the mammary glands (84/176). By contrast, episodic MaP was found in 12 udder quarters (6.8%), and episodic MiP was present in 40 quarters (22.7%). At both sampling times, the other 40 mammary glands (22.7%) were free of mastitis pathogens.

Statistically significant differences ($p < 0.05$) in mastitis pathogen distribution were observed when comparing the high MDi alarm case group (G) cows to the low MDi control group (K) cows. The biggest difference between the frequency of episodic MaP presence in milk and the number of udder quarters free of mastitis pathogens can be found. By contrast, continuous MiP in both groups had the same number, with 37 continuous MiP quarters for cows in the case group and the same number of continuous MiP quarters for cows in the control group (*Table 7*).

MaP's and MiP's presence in the udder quarter's foremilk at the two sampling occasions strongly relates to the SCC. The figure shows (*Fig. 1*) that the average SCS depends on the mastitis pathogens' group and persistence. The lowest SCS, up to a maximum of 3 log₂ units or 100 000 cells mL⁻¹, was found in milk from quarters free of mastitis pathogens at both milk sampling times and similarly low

SCS also in the udder quarter's foremilk with an episodic presence of the MiP. The highest mean SCS value exceeding $5 \log_2$ units or 400 000 cells mL⁻¹ has been observed in milk from those udder quarters where continuous MaP presence is detected.

When aggregating the results of quarter-level bacteriological examinations of milk into the udder level of the cow, it is observed that a single mastitis pathogen affects 24.4% (11/45) of all cows during the first sampling, while 35.6% (16/45) during the second sampling (*Table 8*). The proportion of cows found negative in bacteriological testing in all four quarters, 11.1% (5/45) in the first and 2.2% (1/45) in the second, respectively, has also changed from the first to the second time the milk samples were collected. Overall, the observed percentage of cow statuses indicating a single pathogen, multiple pathogens, and being free of pathogens does not exhibit significant changes between the first and second milk sampling times within 10 to 14-day period. However, the specificities observed for the number of quarters of udder affected by certain mastitis pathogens may be noted. Coagulase-positive staphylococci and *Enterococcus spp.* usually affect one, or less often two, quarters of the udder in a cow. Coagulase-negative staphylococci and esculine-positive streptococci are found in one or two quarters, but some cows shed out these pathogens with milk from three quarters. The placement of *Corynebacterium bovis* by quarters of the cow's udder has been observed to be more varied as it is detected both as a one-quarter pathogen and in the milk of two, three, and even all four quarters of the udder. Our study found that the appearance of *Corynebacterium bovis* at the second time of milk sampling, compared to the first time, usually occurred in one or two quarters of the udder, but is also possible in three quarters at a time. This raises reflections on necessary solutions to reduce the prevalence of corynebacteria in the herd, where a milking robot is utilized in milking. According to some authors, the prevalence of corynebacteria could be even higher, as there are grounds to consider the mammary gland infected with corynebacteria even if the SCC < 100 000 cells mL⁻¹ and the presence of corynebacteria in milk is detected (Lücken, Wente et al., 2021).

The appearance of the mastitis pathogens (the pathogen was not detected in cow's milk at first sampling, but the presence appeared at second milk sampling) was evaluated with a mixed effects logistic regression model of the udder quarters. The probability of a MiP appearance increases if a lower SCC is observed in the udder quarter's foremilk at the first sampling time. In comparison, the occurrence of a new MiP at the second sampling time is lower for quarters with higher SCC. The model considers that the quarters of one udder are not independent units but common components of one udder. The internal structure of the dataset also confirms this fact: the probability of a new MiP appearing in a given quarter of the udder correlates positively with the probability of infection occurring in other mammary glands of the same cow (Intraclass Correlation

coefficient ICC = 0.27 ± 0.16 ; 95% CI 0.07...0.65). According to the logistic regression model, for standard lactation cows, if the SCS is one \log_2 unit lower at the first collection of milk samples, the probability of a new MiP appearance at the second milk sampling is 1.8 times higher ($1/\text{OR} = 1/0.56=1.8$; $p < 0.05$). At the same time, for cows with an extended lactation of more than 305 days, the possibility of a new MiP appearance does not depend on the SCC in the udder quarter's foremilk, as indicated by the upper line of the figure without a slope, i.e., without significant reduction in the probability of new MiP appearance if the SCC increases ($p > 0.05$) (Fig. 2).

The results from our study are in line with the works of other authors (Bexiga, Koskinen et al., 2011), who have studied samples with negative bacteriological findings in-depth. They identified some bacterial mastitis pathogens in the “bacteriologically negative” milk samples, namely 47% of milk samples with $\text{SCC} > 500\,000$ cells in mL^{-1} , by re-examining the sample with pre-treatment (freezing and thawing of the sample) or using more sensitive methods such as polymerase chain reaction. Literature on AMS also reveals other authors' observations that on farms with a milking robot, cows are less likely to become infected with *Streptococcus uberis* than on farms with normal milking, but this is mainly explained by the fact that robots are mostly installed in rebuilt farms that have not yet accumulated an endemic microbiota (Taponen, Liski et al., 2017).

Online cell counter OCC effectiveness

The SCC was measured in 31 cows by an online cell counter (OCC), and the results were compared by laboratory instrumental method for the same milking time (Fig. 3). As a diagnostic device, the OCC which is built into the milking robot can accurately find cows with high SCC. The good agreement in results justifies using OCC for semi-quantitative evaluation of SCC for an individual cow's milk.

The repetition of SCC measurements at each milking time gives an overall picture of the fluctuations in the SCC levels of each cow. During the study, each cow had between 63 and 106 individual milkings, averaging 2.8 ± 0.3 times daily. At each milking, the SCC in the cow's milk was determined by OCC and summarized as SCC individual dynamics in the whole study period. Four types of individual dynamics for SCC were found in both the MDi case group and the control group. However, each group had a different proportion of these types. The figure (see Fig. 4) shows the relationship between the type of individual dynamics of a cow's SCC and the mastitis detection index MDi. In other words, there is a significant difference between the distribution of the types of individual dynamics of the SCC in cows with $\text{MDi} < 1.4$ and those with $\text{MDi} \geq 1.4$ (see Fig. 4). This shows that the first and second types of individual dynamics of the SCC

were more common in cows in the control group and the third and fourth types in cows in the case group.

The figure (see *Fig. 5*) shows the relationship between the type of individual dynamics of a cow's SCC and the actual SCC in the milk control recording test during the month in question.

In comparison with the results of the bacteriological testing, the conformity of the individual dynamics type with the group of mastitis pathogens detected in the cow udder quarter's foremilk and the permanence of its presence in the mammary gland was determined (see *Fig. 6*). It should be noted that the number of the udder quarters of the individual dynamics type 1 and type 2 cows affected by the presence of the MaP in milk does not exceed 5% of all quarters of those cows. In addition, the continuous presence of MaP was detected in only one udder quarter in a cow with SCC individual dynamics type 2 but was not observed in type 1 cows at all. Also, when comparing the presence of prolonged MiP in an udder quarter's foremilk, it is more common in SCC individual dynamic type 2 cows than in type 1. An episodic MiP was more commonly found in SCC individual dynamics type 1 cows. For individual dynamics, type 1 and type 2 cows, more than 30% of the udder quarters did not show the growth of any mastitis pathogen from the milk samples. In cows with type 3 and type 4 of the SCC individual dynamics, a significantly higher presence of the MaP in milk has been observed compared to type 1 and type 2. In total, 50% of all mammary glands have been observed positive for continuous or episodic MaP in cows with type 3 and type 4 dynamics. Of all types of SCC individual dynamics, the highest continuous presence of MiP ($> 40\%$) was observed in type 3 cows. The presence of episodic MiP in the udder quarter's foremilk in type 3 and type 4 cows has been relatively rare, only up to 10% of their udder quarters.

Overall, when comparing the observed differences between the four types of SCC individual dynamics, the role of the presence of mastitis pathogens in the sequence from type 1 to type 4 increases both quantitatively (proportion of affected quarters) and qualitatively (presence of episodic or continuous MaP).

The proportions of the four types of the SCC individual dynamics affect the whole dairy herd and the quality of the milk that is produced. Of importance is that the ratio of the type 4 cows to the type 1 and type 2 cows must be kept as low as possible.

Our study has found that the measurements obtained using OCC from 20 milking times will highlight the current type of the SCC individual dynamics in cow's milk. Shorter evaluation periods or few milkings without OCC measurement results make it difficult to evaluate the SCC individual dynamics, as cows of type 4 may also have SCS < 4 or SCC $< 200\,000$ cells mL $^{-1}$ in several successive milkings.

Mastitis detection index MDi effectiveness

MDi results were obtained and compared for 20 cows out of 522 milkings over a 21-day period, while the total number of milkings for these cows was 942 times, as confirmed by a full backup copy of the milking robot system. Each cow in the case group was milked an average of 2.1 (0.71) times a day, compared to 2.4 (0.68) milkings in the control group. No clinical mastitis was observed in any cow. A milking robot group's cows were selected based on the MDi value. MDi results in the case group and the control group are shown in Fig. 7. Average MDi values in the case group were consistently higher than in the control group. Over three weeks, MDi levels in the case group gradually decreased (coefficient of linear regression $b = -0.01$, $p < 0.05$).

This study found that cows with higher MDi values (case group) had more episodic MaP and fewer bacteriologically negative findings than cows with low MDi values (control group). Concerning the number of udder quarters with continuous MaP and MiP, there was no difference between high and low MDi cows. This study compared mastitis pathogen groups of MaP and MIP as a cause of subclinical inflammation in finding MDi applicability to track bacterial pathogens. At the same time, more attention was paid to the variability of the agents when assessing the episodic and continuous presence of the pathogens in the cow udder quarter's foremilk samples. Since the udder quarters with a continuous MaP presence contributed to the most increase in SCC, early mastitis treatment would be indicated for such cows without a delay. Increased MDi in this respect could be an important first signal for an infection process in the mammary gland. However, in the study comparing case and control cow groups based on the MDi signal, continuous MaP infections have appeared similarly divided between groups – four in the case group and six in the control group (Table 7). The 74 udder quarters harboring a continuous MiP, mainly *Corynebacterium spp.*, were also equally partialized between case and control groups in similar numbers (Table 7). With the continuous presence of a pathogen in the mammary gland, the risk of biofilm formation is known to increase, which impairs the recovery prognosis if a given pathogen causes clinical mastitis with time. The formation of bacterial biofilms on the epithelial surface of the mammary gland reduces the effectiveness of treatment. Chronic mastitis develops if the treatment fails, which can lead to cow culling (Hordofa, 2022). Some authors attribute elevated MDi values to biological changes in the udder or even in the whole body of the cow (Forsbäck, Lindmark-Måansson et al., 2010).

The mean values for milk electrical conductivity for case and control groups are compared in the table (Table 9). At cow udder level, the mean value in the case group was significantly higher than in the control group ($4634 \pm 22.5 \mu\text{S cm}^{-1}$ versus $4562 \pm 16.3 \mu\text{S cm}^{-1}$, $p < 0.05$). However, both results were below the mean conductivity values observed in healthy ($5300 \mu\text{S cm}^{-1}$) and subclinically infected cows ($5700 \mu\text{S cm}^{-1}$) by other authors.

MDi threshold for the diverting of low-quality milk

The study also investigated how the use of MDi to divert milk from individual cows would be linked to the SCC of the total milk produced by the herd. Overall, the case group with a high MDi had a significantly higher SCS compared to the control group (3.4 (0.48) *versus* 2.4 (0.46), respectively). During the study period, 60% of cows with higher MDi also had SCC values above 200 000 cells mL⁻¹. However, the correlation between MDi and SCS was only moderate ($r = 0.37$, $p < 0.05$). This could be explained by the fact that certain cows had a marked discrepancy between these indicators.

To characterize the overall effectiveness of MDi in recognizing cows with a milk SCC exceeding 200 000 cells mL⁻¹, Cohen's Kappa coefficient was calculated from 430 milkings, and the agreement was found to be low ($\kappa = 0.28 \pm 0.048$). This shows that the MDi and SCC changes are not parallel.

MDi threshold values for the automatic diversion of milk of non-compliant quality were modeled using MDi and weighted SCS, considering the quantity of milk produced by each cow. It was established that the total quantity of diverted milk at the MDi threshold value of 2.0 would be 102 kg or 2.3% of the total milk produced (4387 kg). The milk diversion would be carried out on nine milking cows, and the theoretically calculated diverted milk SCC would be 422 000 cells mL⁻¹. The average SCC of the milk in the bulk tank would be approximately 155 thousand cells mL⁻¹. From a practical point of view, the diversion of milk of non-compliant quality, using such a threshold, helps to maintain control of the SCC level of the milk stored in the whole milk container below 300 000 cells mL⁻¹. Any lower MDi threshold, such as 1.8, would increase the amount of diverted milk to 265 kg (6% of all milk produced) with an SCC of 360 000 cells mL⁻¹. In this case, the SCC in the bulk tank milk of the herd would decrease to 148 000 cells mL⁻¹, which would have no practical effect compared to 155 000 cells mL⁻¹ by applying the MDi threshold value of 2.0 for the diversion of milk of non-compliant quality.

The mastitis detection index (MDi) is designed to effectively recognize those cases where clinical mastitis appears in a cow in the robotic milking process (Bausewein, Mansfeld et al., 2022). However, as our study results show, an increase in MDi values and a gradual return to baseline levels also occurs in subclinical udder health disorders.

Viscosity principle-based SCC sensor's effectiveness

The results of the SCC measured by the viscosity method for 111 cows have been compared to those determined by the laboratory instrumental method in a sample of whole cow's milk obtained at the same milking time. The comparative dataset of SCC results also includes SCC data for each cow's previous two

milking and the subsequent five milkings that follow the milk recording control test sample. The milking frequency of cows is characterized by the fact that the number of milking times for cows in the herd varied between 5 and 21 times over four days, and the average number of milking times over a twenty-four-hour period was 2.86 ± 0.07 times per cow.

The figure (*Fig. 8*) compares the SCC results obtained by the viscosity method with the results of testing the milk's SCC using the laboratory instrumental method. All discrepancies between the two methods are associated with SCC values ranging from 100 to 500 000 cells mL⁻¹. Therefore, when interpreting the SCC, each cow with a measurement value within that range should be retested at the next milking.

Subsequent agreement analysis of the viscosity method and laboratory instrumental method results was carried out by extending the time interval to include viscosity SCC measurements during other milking times of each cow before and after milk recording control. It should be noted that the number of cows with an $\text{SCC} > 200\,000$ cells mL⁻¹ based on the viscosity method measurements was lower than according to the laboratory instrumental method assessment. Therefore, the number of false negatives exceeded the number of false positives in all milking sessions (*Table 10*).

Obviously, there is a significant coincidence with the milk recording control test milking, but it is not very high as Cohen's kappa coefficient value is only 0.71 ± 0.09 . Cohen's kappa coefficient hardly changes in milking before and after the milk recording control test. However, looking at viscosity SCC averages from several consecutive milkings, Cohen's kappa values were raised above 0.80, suggesting a very good agreement (Watson & Petrie, 2010). Although the highest kappa value of 0.88 ± 0.09 was observed for the mean value calculated from two viscosity principle-based SCC measurements, i.e. milk recording control test milking (0) and subsequent milking (+1), similar kappa values of 0.81 ± 0.09 were also observed for the mean SCC calculated from 3 and 5 successive milkings.

Lin's concordance correlation coefficient of 0.94 during the milk recording control test (*Fig. 9*) confirms only a moderate quantitative agreement between both methods. In milking times before and after the test, the Lin's concordance correlation coefficient values decrease even further, which confirms the individual fluctuations and dynamics of SCC.

When measuring the SCC by viscosity method at each milking time, the dynamics of the SCC are observed, which is not recognized by a single measurement by the laboratory instrumental method. Thus, we conclude that the SCC measurements by viscosity method should be used constantly to find cows with a high SCC so that the average can always be calculated. Regular viscosity SCC measurements demand relatively low costs, making them feasible to perform at every milking.

Acquisition of transferable embryos depending on donor cow's milk SCC

During induction of MO and embryo collection, 24 out of 30 donors (80%) successfully responded to MO treatment. The mean number of *corpus luteum* (nCL) was 7.7 (range 1 to 19). A total of 151 embryos (nE) were produced, 104 of which were transferable embryos (nTE). No embryos were acquired from the two donors. nCL was found to correlate moderately with nE ($r = 0.65$; $p < 0.01$) and nTE ($r = 0.57$; $p < 0.01$).

The effect of the SCC on the number of transferable embryos is shown in the figure (Fig. 10). Overall, we can conclude that nTE differs for analogous donors with different SCC in the month before MO induction, as embryo production decreases as SCC increases. In addition, the effect on nTE is not only manifested in donor cows with high SCC but also in the range $\text{SCC} < 200\,000 \text{ cells mL}^{-1}$. The prognosis suggests that 6.5 transferable embryos are obtained if $\text{SCC} = 50\,000 \text{ cells mL}^{-1}$ and 3.5 embryos are obtained if $\text{SCC} = 200\,000 \text{ cells mL}^{-1}$, thus an average reduction is predicted by 3 transferable embryos. The model nTE (Table 11) showed a significant association ($p < 0.05$) for factors such as serum Na^+ , absolute eosinophils count (EO) on the first day of MO induction, mean ambient air temperature and SCS in the month preceding embryo acquisition. The nTE model also predicts a 3.3 embryo reduction if the donor cow's SCS rises from 2.2 to 4.6 while the other variables remain unchanged (ambient air temperature, Na^+ , EO, and cow breed).

Considering all the results of the study as a whole and comparing them with the findings described by other authors in the literature, it can be concluded that the timing of the study and the three unique blocks of study material, which are thematically unified on the possibilities of different technical solutions for evaluating SCC, confirm the hypothesis of the promotional work. They demonstrate the scientific importance and practical application aspects of the complex evaluation of SCC results in improving cow udder health and preserving bovine breeds at risk. These findings are crucial for the development and interaction of both the veterinary and livestock sectors.

The study also demonstrates that SCC serves as more than just a parameter of milk quality; it also acts as an indirect indicator of a cow's health and reproductive abilities. This finding is crucial for the further development of technological solutions in milk production, as it underscores the potential for reducing human presence by replacing it with automated solutions.

CONCLUSIONS

1. Subclinical udder infection - continuous MaP and MiP, as well as episodic MaP presence in an udder's quarter - elevates SCC in milk, while episodic MiP presence does not significantly increase SCC.
2. The online cell counter OCC of the milking robot as a diagnostic aid, operating on a fluoroptic principle, accurately recognises cows with $\text{SCC} > 200\,000 \text{ cells mL}^{-1}$ detected by laboratory instrumental method.
3. The mastitis detection index MDi used in the milking robot system represents the individual dynamics of the SCC in only 60% of cows, and the efficacy of MDi for accurately identifying cows with $\text{SCC} > 200\,000 \text{ cells mL}^{-1}$ is low.
4. With MDi as a criterion for automatically detecting and diverting abnormal milk, applying the limit value $\text{MDi} = 2.0$ ensures that the SCC in the bulk tank milk will not exceed $300\,000 \text{ cells mL}^{-1}$.
5. Using the viscosity principle-based sensor MQC-C2, the diagnostic accuracy of a given mean SCC from two consecutive cow milkings is significantly higher to recognize a cow with $\text{SCC} > 200\,000 \text{ cells mL}^{-1}$ compared to a single measurement of SCC.
6. For embryo donors with $\text{SCC} > 200\,000 \text{ cells mL}^{-1}$ in the month preceding induction of multiple ovulation, a reduction by at least three transferable embryos is predicted compared to an analog donor with an SCC of $50\,000 \text{ cells mL}^{-1}$.
7. The somatic cell count serves not only as a parameter for mastitis diagnostics and milk quality evaluation but also as an indirect indicator of udder protection and reproduction capacity in dairy cows. The evaluation of its dynamics becomes increasingly crucial with automation of technological solutions for milk production.

PRACTICAL RECOMMENDATIONS

1. It is recommended to evaluate the SCC in 20 consecutive milkings using an online cell counter (OCC) operating on a fluoroptic principle to evaluate the individual SCC dynamics type, which may indicate subclinical mastitis in the udder of the cow and the presence of MaP in milk.
2. When measuring cow's milk SCC with a viscosity principle-based sensor MQC-C2, it is recommended that measurements be taken at each milking time, as the mean value from two consecutive milkings more accurately describes the health status of the cow's udder than the result obtained at one milking time.
3. The selection of donors for multiple ovulation and embryo collection should consider the temperature of the ambient air and the potential donor's SCC in milk one month before MO induction and embryo acquisition.