

Ankstyvoji karvių veršingumo diagnostika imunologiniais tyrimo metodais

Per pastaruosius dešimtmečius, kai didesnės ar mažesnės krizės grėsmė vertė žmogaus veiklą nukreipti kuo racionalesnių sprendimų keliu, gamtos, medicinos, veterinarijos mokslų srityse atsirado pažangių, patikimų kasdieniniuose darbuose atsirandančių problemų sprendimo būdų. Ne išimtis ir gyvulininkystės sektorius, kuris reikšmingas Lietuvai, aprūpinant gyventojus maisto produktais, bei svarbus eksporto šaltinis. Jam pastaraisiais metais mokslas skyrė nemažai dėmesio, teikdamas naujoves, šiuolaikiškus, patogius, patikrintus ir konstruktyvius pasiūlymus.

Panagrinėkime vieną iš aktualių problemų, tokių, kaip galvijų bandos reprodukcijos problema. Neabejotina, kad sėkmingos pieno ūkio raidos garantas yra optimali bandos reprodukcija. Dėl sutrikusios karvių reprodukcijos ar pavėluoto sėklinimo, ūkininkai patiria nemažų nuostolių. Pastaraisiais metais Lietuvoje pieno ūkiai stambėja, didėja primilžiai, kartu daugėja ir įvairių reprodukcijos problemų. Produkcija su sveikata ir reprodukcija itin siejasi didelio produktyvumo bandose (Windig et al., 2005). Pastebėta tendencija, kad, didėjant karvių pieningumui, prastėja karvių reprodukcinės savybės. Produkcijos įtaka karvės sveikatai netiesioginė. Didėjant išmilžiui, didėja karvės poreikiai, kuriuos vis sudėtingiau patenkinti. Maksimalaus reprodukcinio pajėgumo būna 5–7 metų amžiaus karvės. Su karvių amžiumi didėja embrionų mirtingumas ir dėl nevisaverčio kiaušinėlio išsivystymo mažėja apvaisinimo galimybė. Supratimas apie karvės nevaisingumą grindžiamas ekonominiais skaičiavimais. Natūralu, kad ne visos šiuolaikinių veislių pieninės karvės apvaisina per tris mėnesius po veršiamosios. Neapvaisinimo priežastis – didelis produktyvumas ir sutrikusi energijos apykaita. Energijos deficitas išnyksta, pasiekus laktacijos piką. Sumažėjus produktyvumui, susidaro sąlygos reprodukcijos sistemai „įsijungti“. Nevaisingomis laikomos tos karvės, kurios neapvaisina sėklinant 4–5 kartus (arba iki 160 dienų po apsveršiamosios).

Genetinis karvių bandų gerinimas, norint gauti kuo daugiau pieno, mažina karvių vaisingumą, kelia didesnius mitybos reikalavimus. Šiuolaikinių veislių karvėms būdingi neryškūs rujos požymiai. Nuo 10 iki 40 proc. karvių apskritai neturi rujos požymių. Manoma, kad tai neteisingos atrankos ir didelio produktyvumo pasekmė. Parenkant galvijus poravimui, paprastai kreipiamas dėmesys į galimus pieno kiekio ir sudėties pokyčius. Stambesnių ūkių šeimininkai įvertina ir galimus eksterjero pokyčius, kurie palengvintų veršiamąsias. Užsieninių bulių kilmės kortelėse nurodoma buliaus genetinė įtaka somatinių ląstelių skaičiui (SLS).

Žinome, kad nėštumo trukmė yra savita kiekvienai gyvūno rūšiai. Ji nepriklauso nuo sėklinimo būdo, metų, kergimo ar sėklinimo laiko, rujos trukmės ar intensyvumo. Kadangi kalbame būtent apie karvių veršingumo diagnostiką, svarbu žinoti, kad veršingumo trukmė priklauso nuo gyvulio amžiaus, veislės, kūno masės, aplinkos temperatūros, užsimezgsio embriono lyties, ypač daug įtakos turi genetiniai veiksniai. Karvių veršingumo trukmė gali tęstis 280-286 paras.

Veršingumas nustatomas pagal karvės išvaizdą. Jaunesnių karvių bei telyčių ypač ryškiai pasikeičia plaukų danga, tapusios veršingos jos ima „blizgėti“. Nuo šešto mėnesio, kai gimda jau būna pilvo laštoje, ryškiai padidėja dešinysis šonas.

Klinikinius požymius (specialūs gimdos kaklelio, makšties ir kiti pokyčiai) vertina veterinarijos gydytojas. Veršingumą tiriant rektalinės palpacijos metodu, galima nustatyti, kad dviejų mėnesių veršingos karvės vaisingas gimdos ragas yra beveik dvigubai didesnis už nevaisingą ragą. Nežymiai pastorėjusi vidurinė gimdos arterija.

Trijų mėnesių veršingos karvės vaisingas gimdos ragas, jau 3-4 kartus didesnis už nevaisingą, keturių mėnesių ima jaustis karunkulai, o nuo penkto mėnesio jaučiama gimdos arterijos vibracija.

Yra galimybė veršingumą nustatyti pagal anamnezės duomenis, stebint karvės rują. Nerujojimas (anestrus) po apsiveršavimo yra pagrindinė priežastis, dėl kurios užsitiesia periodas nuo veršiamosios iki sėklinimo (servis periodas). Skiriamos keturios klinikinės nerujojimo formos: „tyli“ ruja, kiaušidžių folikulinės cistos, kiaušidžių funkciniai sutrikimai ir susilaikęs geltonkūnis. Apie kiaušidžių funkcinį pajėgumą galima spręsti pagal kiaušidžių palpuojamąją formą. Tikrinama, ar kiaušidžių dariniai atitinka lytinio ciklo periodą. Tiksliau tai galima nustatyti skenuojant ultragarsu. Ultragarso tyrimo metu kiaušidžių darinius įmanoma skaičiuoti, matuoti, o svarbiausia, atliekant pakartotinį tyrimą, – tiksliai įvertinti folikulų ir geltonkūnių augimą ar regeneraciją. Diagnostikos tikslais ypač svarbu įvertinti folikulų augimą. Kadangi šį procesą reguliuoja hormonai, augimo faktorius, ląstelių tarpusavio sąveika ir genai, folikulų augimas geriausiai atspindi karvės reprodukcinį pajėgumą. Lytinio ciklo metu folikulai auga dviem bangomis, rečiau trimis ir keturiomis. Folikulų augimo bangų skaičiui įtakos turi karvės amžius, sezonas, primilžis.

Vis tik, tiksliausiai veršingumą galima įvertinti laboratoriniais tyrimais, vertinant hormonų (progesterono) raidos pokyčius, kurie atsiranda nėštumo metu. Nustatomas karvių kiaušidžių aktyvumas ir lytinio ciklo visavertiškumas. Progesteroną išskiria geltonkūnio ląstelės. Esant fiziologinei lytinio ciklo eigai, progesterono koncentracija kraujyje padidėja 4-ą ciklo dieną, 8-ą dieną pasiekia aukščiausią lygį ir išsilaiko iki 17-os dienos. Pagal hormono koncentraciją nustatomas tinkamiausias sėklinimo laikas. Rujos metu progesterono koncentracija mažiausia. Nesumažėjęs hormono kiekis 21–24 parą po sėklinimo rodo, kad karvė veršinga. Išnykęs lytinis ciklas ir didelė progesterono koncentracija yra susijusi su geltonkūnio ar liuteinizuotomis kiaušidžių cistomis, užsilaikiusiu geltonuoju kūnu.

Gali būti naudojamas histologinis metodas, - tai citologinis makšties gleivinės mėginio įvertinimas. Gleivinės ląstelių dydis ir forma ypač priklauso nuo hormonų raidos. Nėštumo pradžioje kraujyje padidėja estrogenų ir jų metabolitų. Jie pastebimai pakeičia epitelinių ląstelių biologiją. Citologinis metodas yra gana tikslus, bet, dėl sudėtingumo, retai taikomas.

1980 metų viduryje sukurtas prietaisų ir antikūnų rinkinys progesteronui nustatyti. Atlikus tyrimą, tiksli progesterono koncentracija nėra nustatoma, tačiau pagal testo spalvos pokyčius galima spręsti, ar ji „aukšta“ ar „žema“. Reakcija vertinama vizualiai arba elektroniniu skeneriu. Spalva vertinama po pusės valandos nuo reakcijos pradžios ir sulyginama su standartine progesterono koncentracija.

Progesterono koncentracija kraujyje ir piene koreliuoja. Progesteronas yra pieno riebalams giminingas steroidinis hormonas, todėl piene nustatoma didesnė jo koncentracija. Santykinė kraujo ir pieno progesterono koncentracija yra tokia pat. Tyrimui netinka pieno mėginiai, paimti iš mastitu sergančių karvių, nes dėl uždegimo pakinta pieno sudėtinųjų dalių santykis. Didelė progesterono koncentracija 20–24 parą po sėklinimo leidžia nustatyti veršingumą tik 75 proc. tikslumu.

Šiuo metu hormonai nustatomi imunofermentinės analizės metodu (IFA) ir šio metodo pagrindu sukurti diagnostiniai rinkiniai įvairiems hormonams identifikuoti.

2011 metų rugpjūčio 9 dieną Amerikoje buvo pristatytas naujas „Ankstyvasis karvių veršingumo nustatymas IFA metodu“ diagnostinis rinkinys, pagamintas „IDEXX Laboratories“ (JAV) gamintojo, bet skirtas ne tik Amerikos, bet jau ir pasaulinei rinkai.

Metodas pagrįstas antigeno – tiriamojo hormono ir antikūno sąveika. Tam monokloniniai antikūnai, tai yra, antikūnai tik prieš tam tikrą antigeną, sujungiami su fermentu, galinčiu taip paveikti bespalvę medžiagą, kad ji virstų su tam tikra išreikšta spalva. Jei nėra antigeno, tai yra, - tiriamojo hormono, tai fermentas būna neaktyvus, nes jis sujungtas su antikūnais. Jei įvyksta sąveika „antigenas – antikūnas“, fermentas atblokuojamas ir taip paveikia bespalvį substratą, kad jo metabolitai tampa pastebimi plika akimi – spalvingi. Tyrimų rezultatai nuskaitomi spektrofotometru, naudojant atitinkamą, metodikoje nurodytą filtro bangos ilgį.

Panagrinėkime plačiau šią galimybę nustatyti karvių veršingumą ypatingai jautriu ir specifišku imunofermentinės analizės metodu bei šio metodo privalumus.

Galimybė yra, kadangi diagnostinis rinkinys jau gali pasiekti Lietuvos institutus bei laboratorijas, dirbančias gyvūnų imunologinių tyrimų srityje. Vardinant metodo privalumus, galima būtų juos išskirstyti į keliatą punktų.

Ankstyva diagnostika. IDEXX Galvijų nėštumo testas tiksliai aptinka glikoproteinus (PAGs) kraujo serume arba plazmoje (EDTA konsevuotuose kraujo mėginiuose) jau 28 parą po to karvės apsėklinimo.

Greitas rezultato gavimas. Rezultatai gaunami tą pačią dieną, kada buvo pristatyti mėginiai, kadangi laboratorijoje tyrimo atlikimas užtrunka tik 2,5 valandos.

Patikimas rezultatas. Atliekant tyrimus iš serumo ir plazmos, diagnostinis jautrumo vidurkis yra 99,5 proc., o specifiškumo vidurkis, - iš serumo siekia 93,1 proc., o iš plazmos, - net 94,7 proc.

Patogus darbo planavimas ir galimybių plėtimas. Veterinarijos gydytojai, gali išplėsti savo siūlomas paslaugas ūkininkams ir, jiems pageidaujant, išsiaiškinti ankstyvą karvės veršingumą be jokio papildomo darbo, tuo pačiu metu, kai galvijams atliekami planiniai stebėsenos (enzootinės galvijų leukozės, galvijų bruceliozės) ar kitu tikslu atliekamų infekcinių ligų tyrimai.

Nacionalinis maisto ir veterinarijos rizikos vertinimo institutas 2012 metais įsigijo ankstyvojo karvių veršingumo nustatymo IFA metodu rinkinį, tikslu patikrinti, ar, naudojant jį Lietuvos galvijų tyrimams, jautrumas ir specifiškumas, kurie yra pagrindiniai kokybės, o tuo pačiu ir teisingo tyrimų rezultato gavimo parametrai, atitinka gamintojų nurodytus parametrus. Tyrimai atlikti laboratorijoje, kur palaikoma kokybės sistema, pagrįsta tarptautiniu mastu pripažintais principais ir standarto LST EN ISO/IEC 17025 reikalavimais.

Serologinių tyrimų skyriaus specialistai, bendradarbiaudami su Alytaus, Lazdijų, Švenčionių, Šalčininkų bei Vilniaus rajonų ūkininkais bei veterinarijos gydytojais, atliko metodo patikrinimą. Tyrimams 336 karvių kraujo serumas buvo atrinktas ir suskirstytas į penkias grupes pagal veterinarijos gydytojo lydimajame dokumente nurodytą karvės sėklinimo datą (1 lentelė).

Tyrimai buvo atliekami 2012 metų balandžio – rugpjūčio mėnesiais, naudojant IDEXX laboratorines (JAV) gamintojų diagnostinį rinkinį „IDEXX Bovine Pregnancy Test“, Ser. Nr. 41169-X011. Šio rinkinio pagalba turėjome galimybę tiriamajame karvių kraujo serume aptikti glikoproteinus (PAGs). Tyrimų rezultatai buvo nuskaityti spektrofotometru ir įvertinti pagal diagnostinio rinkinio gamintojo pateiktus vertinimo parametrus. Atlikta rezultatų analizė, kontrolinių medžiagų standartinio nuokrypio skaičiavimas.

„Truputį veršingų“ karvių nebuvo rasta. Keliolika šimtų diagnostinių rinkinių per savo darbinę praktiką naudojusiems specialistams smagu buvo matyti tiksliai apibrėžtus (teigiama arba neigiama) rezultatus (1 lentelė).

1 lentelė. Tyrimams pagal sėklinimo datą atrinktų karvių veršingumo tyrimų rezultatai

Eil. Nr.	Tiriamų galvijų skaičius	Po karvės sėklinimo praėjęs laikotarpis (paromis)	Veršingumo tyrimų rezultatai:	
			veršingos / neveršingos	
1	24	25 - 28	18	6
2	85	29 - 35	79	6
3	66	36 - 42	50	16
4	84	43 - 49	65	19
5	77	≥ 50	70	7

Tyrimai atlikti laboratorijoje, kur palaikoma kokybės sistema, pagrįsta tarptautiniu mastu pripažintais principais ir standarto LST EN ISO/IEC 17025 reikalavimais. Savaime suprantama, tikrojo tyrimų rezultato teko palaukti iki tol, kol gavome informaciją iš veterinarijos gydytojų po karvėms atliktų rektalinės palpacijos tyrimų. Taigi, visos 54 veršingumo tyrime „neigiamai“ reagavusios karvės po rektalinės apžiūros buvo nustatytos neveršingos. Atliekant ankstyvojo veršingumo tyrimą rastų „teigiamų“, tai yra, veršingų karvių bei po rektalinės apžiūros veterinarijos gydytojų pateikti rezultatai pateikti 2 lentelėje.

2 lentelė. Ankstyvojo karvių veršingumo laboratoriniais tyrimais nustatytų veršingų karvių ir rektalinės apžiūros, praėjus 1-3 mėnesiams po tyrimo datos, rezultatų palyginimas

Po karvės sėklinimo praėjęs laikotarpis (paromis)	Laboratorijoje nustatytų veršingų karvių skaičius	Veršingumo tyrimų po rektalinės palpacijos rezultatai:	
		veršingos / specifiško proc.	
25 - 28	18	15	83,3%
29 - 35	79	76	96,2%
36 - 42	50	49	98%
43 - 49	65	65	100%
≥ 50	70	70	100%

Skaičiai kalba patys už save. Laboratorijos specialistus duomenys antroje lentelėje pradžiugino ne ką mažiau. Dabar tenka laukti, kad Lietuvos ūkininkai ir veterinarijos gydytojai pasinaudotų galimybe greitai ir tiksliai nustatyti ankstyvąjį karvių veršingumą.

Reziumuojant galima būtų pasakyti, kad neabejotinai, kiekvienas galvijų augintojas žino, kad geras karvių vaisingumas turi teigiamos įtakos bandos didinimo planams, vaisingumo gerinimui bei pieninių galvijų augintojų pajamoms. Bandos vaisingumo sėkmė daug priklauso nuo rujos nustatymo ir optimalaus sėklinimo parinkimo laiko, tačiau rujos kokybė ir nustatymas darosi kaskart vis sunkiau sprendžiama ypač augančių pieninių galvijų ūkių problema. Taupant laiką ir lėšas, sumaniausia gamyboje yra naudoti tas siūlomas naujoves, kurios yra sukurtos ilgametę darbo patirtį turinčiose kompanijose, bei patikrintos praktikoje.