

**LITHUANIAN UNIVERSITY OF HEALTH SCIENCES
VETERINARY ACADEMY**

Žilvinas Kleiva

**ANALYSIS OF HEALTH SURVEYS
OF THE BLACK SEA BOTTLENOSE DOLPHINS
(*TURSIOPS TRUNCATUS PONTICUS*)
KEPT IN DOLPHINARIUM**

Summary of Doctoral Dissertation
Agricultural Sciences, Veterinary Medicine (02A)

Kaunas 2013

The research was done in the dolphinarium of Lithuanian Maritime museum, Pathology center of Infectious diseases department of Lithuanian University of Health Sciences, Veterinary Academy in 1996–2013.

Research supervisor – Prof. Dr. Albina ANIULIENĖ (Veterinary Academy of Lithuanian University of Health Sciences, Agricultural Sciences, Veterinary Medicine – 02A).

Veterinary Science Council:

Chairman – Prof. Habil. Dr. Saulius PETKEVIČIUS (Veterinary Academy of Lithuanian University of Health Sciences, Agricultural Sciences, Veterinary Medicine – 02A).

Members:

Prof. Dr. Algimantas PAULASKAS (Vytautas Magnus University, Science of Biomedicine, Biology – 01B);

Prof. Dr. Antanas SEDEREVIČIUS (Veterinary Academy of Lithuanian University of Health Sciences, Agricultural Sciences, Veterinary Medicine – 02A);

Assoc. Prof. Dr. Antanas ŠARKINAS (Food Institute of Kaunas University of Technology, Technological Sciences, Chemical Engineering, 05T);

Prof. Dr. Jūratė ŠIUGŽDAITĖ (Veterinary Academy of Lithuanian University of Health Sciences, Agricultural Sciences, Veterinary Medicine – 02A).

Opponents:

Prof. Habil. Dr. Vytautas ŠPAKAUSKAS (Veterinary Academy of Lithuanian University of Health Sciences, Agricultural Sciences, Veterinary Medicine – 02A);

Prof. Habil. Dr. Aniolas SRUOGA (Vytautas Magnus University, Science of Biomedicine, Biology – 01B).

Public doctoral dissertation defence in Veterinary Science Council will take place at the Veterinary Academy of Lithuanian University of Health Sciences auditorium of Dr. S. Jankauskas 2 p. m. on 27th of September, 2013.

Address: Tilžės str. 18, LT-47181 Kaunas, Lithuania.

The summary of doctoral dissertation was sent on 27th of August, 2013, according to the confirmed list.

The doctoral dissertation is available in the Library of Veterinary Academy of Lithuanian University of Health Sciences.

**LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS
VETERINARIJOS AKADEMIJA**

Žilvinas Kleiva

**DELFINARIUME LAIKOMŲ JUODOSIOS JŪROS
DELFINŲ (*TURSIOPS TRUNCATUS PONTICUS*)
SVEIKATOS TYRIMŲ ANALIZĖ**

Daktaro disertacijos santrauka
Žemės ūkio mokslai, veterinarinė medicina (02A)

Kaunas 2013

Disertacija rengta 1996–2013 metais Lietuvos jūrų muziejuje ir LSMU Veterinarijos akademijoje Užkrečiamųjų ligų katedros Patologijos centre.

Mokslinio darbo vadovė – prof. dr. Albina ANIULIENĖ (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, žemės ūkio mokslai, veterinarinė medicina – 02A).

Veterinarijos mokslo krypties taryba:

Pirmininkas – prof. habil. dr. Saulius PETKEVIČIUS (Lietuvos sveikatos mokslų universiteto veterinarijos akademija, žemės ūkio mokslai, veterinarinė medicina – 02A).

Nariai:

Prof. dr. Algimantas PAULAUSKAS (Vytauto Didžiojo universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01B);

Prof. dr. Antanas SEDEREVIČIUS (Lietuvos sveikatos mokslų universiteto veterinarijos akademija, žemės ūkio mokslai, veterinarinė medicina – 02A);

Doc. dr. Antanas ŠARKINAS (Kauno technologijos universiteto Maisto institutas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija-05T);

Prof. dr. Jūratė ŠIUGŽDAITĖ (Lietuvos sveikatos mokslų universiteto veterinarijos akademija, žemės ūkio mokslai, veterinarinė medicina – 02A).

Oponentai:

Prof. habil. dr. Vytautas ŠPAKAUSKAS (Lietuvos sveikatos mokslų universiteto veterinarijos akademija, žemės ūkio mokslai, veterinarinė medicina – 02A);

Prof. habil. dr. Aniolas SRUOGA (Vytauto Didžiojo universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01B).

Disertacija bus ginama viešame Veterinarinės medicinos mokslo krypties tarybos posėdyje 2013 m. rugsėjo 27 d. 14 val. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Veterinarijos akademijos dr. S. Jankausko auditorijoje.

Adresas: Tilžės g. 18, LT-47181 Kaunas, Lietuva.

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2013 m. rugpjūčio 27 d. pagal patvirtintą adresų sąrašą.

Su disertacija galima susipažinti LSMU Veterinarijos akademijos bibliotekoje.

INTRODUCTION

Dolphins (*Tursiops truncatus*) are the dolphin species most often kept in dolphinariums, water parks and zoos. These creatures are easily trained, communicate with people and are not aggressive (Kreiviniene, 2011). In 1994, in Lithuanian Maritime museum the only dolphinarium on the Eastern Baltic seashore where Black sea dolphins (*Tursiops truncatus ponticus*) are kept was opened. Currently the Lithuanian Maritime museum has been paying a great deal of attention to various educational programmes about dolphins as well as other sea mammals.

In scientific literature there are data about the changes of blood indices of healthy dolphins that live in wild (Hyne et al., 1986; Hall et al., 2007; Terasawa et al., 2002), however, no data could be found about the ranges of hematologic indices of the Black sea dolphins that are kept in dolphinariums during their growth, development or maturing period.

The research of literature found that hematological indices of the dolphins (*Tursiops truncatus*) from different areas of the Atlantic vary. Only a few researchers have compared and analyzed the changes of blood indices of this species when it lives in wild (Ortiz, Worthy, 2000; Aubin et al., 2011). L. H. Schwacke and other researchers (2009) maintained that certain hematologic indices vary depending on dolphins' age, gender and females' fertility period. It has also been found out that blood parameters vary depending on the time of dolphins' adaptation if they are kept in the dolphinarium (Sokolov, Romanenko, 1997). However, no scientific research data has been found related to the physiological norms of blood indices depending on different age and sex of the Black sea dolphins (*Tursiops truncatus ponticus*) that are kept in dolphinariums.

Female dolphins give birth to calves every three or four years. The first days after birth are crucial for baby-dolphins' survival. The death rate of baby-dolphins in the wild is quite high and reaches 30 percent (Mann et al., 2000). In an attempt to increase the calves' survival in dolphinariums, they try to find ways and create most favorable conditions in which females and calves can be kept (Jacobsen et al., 2003). In an attempt to more accurately evaluate the calves and female dolphins' state of health, it is important to observe the animals' behaviour (Russell et al., 1997; Reid et al., 1995). Calves and females' respiratory rate is a rather objective criterion for evaluating animals' physiological state (Sweeney et al., 2010; Makara et al., 2007; Thurman, Williams, 1986). In some dolphinariums they believe that the best option is to keep calves and their mothers separately from other dolphins; their separation is done before the calves are born (Lacave, 1991). This is done to avoid other dolphins' aggression towards the calf and the

female (Parsons et al., 2003) and to make it easier for the female to take care of the calf. Females have to remain vigilant at all times because the young can hit against the walls of the pool or fencing and may hurt themselves or be hurt. The rest periods are rear and short (Morisaka et al., 2010; Ridgway, 1986). It seems that it may be easier to move for females and calves in a bigger pool. The question remains how and where the females could be prepared for giving birth to calves as well as looking after them during the postnatal period.

Dolphins are sensitive to various factors of the surroundings; as a result, both the dolphins that live in the wild and those that are kept in dolphinariums suffer from various diseases. The research found that the animals that are kept in dolphinariums can suffer from laryngitis, pneumonia, sinusitis and other respiratory diseases. The symptoms of diseases are noticed only after the animals' behaviour, breathing movements have changed or if there is loss of appetite (Venn-Watson et al., 2012). When early symptoms of a disease are observed or when the diagnosis of the disease is to be specified, blood tests are the most important and objective indicators to evaluate the state of dolphins' health.

It has been ascertained that the agents of animals' pneumonia are morbilliviruses (Krafft et al., 1995), nocardia bacteria (Lager et al., 2009), microscopic fungi *Cryptococcus neoformans* (Miller et al., 2002). Candidosis is frequently related to treatment with antibiotics and corticosteroids or to water pollution (Miller et al., 2002). *Staphylococcus aureus* can be the cause of pneumonia, septicemia, embolic nephritis and encephalitis (Higgins, 2000). Dolphins' calves that do not get mother's milk are sensitive to bacterial infection and die because of sepsis (Van Elk et al., 2007). The reasons of dolphins' death are scarcely described in scientific literature. Due to this, the Lithuanian Maritime museum was encouraged to do analysis of the reasons causing its dolphins' deaths.

Topicality of the issue

Dolphins are sensitive to the conditions of the environment. If you want to keep dolphins, it is important to create most favourable conditions in the dolphinarium, determine the diseases in time and to find out the reasons of deaths. To do it, it is necessary to identify individual morphological and biochemical blood parameters and their changes when dolphins fall ill. In scientific literature most often there can be found the data of blood tests of the Atlantic (*Tursiops truncatus*) and other dolphin species. However, there is no data related to blood indices of the Black sea dolphins (*Tursiops truncatus ponticus*) that differ in age and sex.

The aims and goals of the thesis

The aim of the thesis is to identify the influence of various factors on blood indices and breathing function of the Black sea dolphins (*Tursiops truncatus ponticus*) that are kept in dolphinariums and also to do analysis of the reasons of dolphins' diseases and death.

The goals of the thesis:

1. Determine the physiological morphological and biochemical parameters of the dolphins' blood with regard to their age and sex.
2. Determine the influence of the size of the pools on the respiratory rate of dolphin females and calves during the postnatal period.
3. Analyze the diseases affecting dolphins and the frequency of their occurrence.
4. Study morphological and biochemical changes in dolphins blood parameters with regard to the diseases.
5. Identify the causes of death through pathological, anatomical, histopathological and microbiological examinations.

Innovativeness and practical meaning of the research

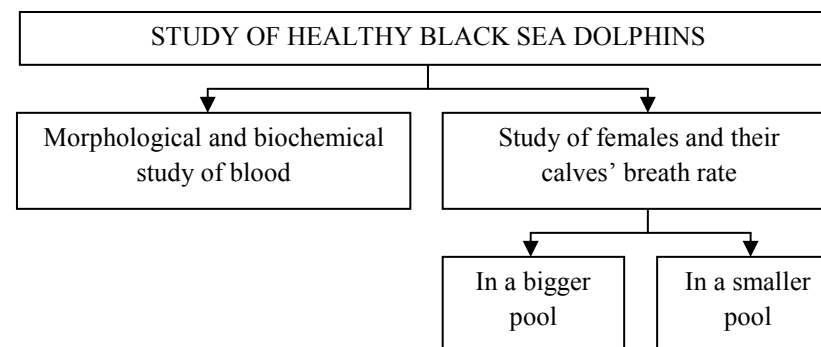
The research has broadened the scientific knowledge about the Black sea dolphins' (*Tursiops truncatus ponticus*) physiological characteristics and pathological conditions. It has been found out that the size of a pool has influence over the Black sea dolphin females and calves' respiratory rate as well as behaviour. Bearing in mind that there are genetic differences among other *Tursiops truncatus* dolphins, in the current research healthy Black sea dolphins' blood physiological morphological and biochemical parameters have been identified with regard to their age and sex. It is the first time in Lithuania when the frequencies of dolphins' diseases, the causes of the diseases have been analyzed and patomorphological changes of the dead animals have been evaluated.

STUDY MATERIALS AND METHODS

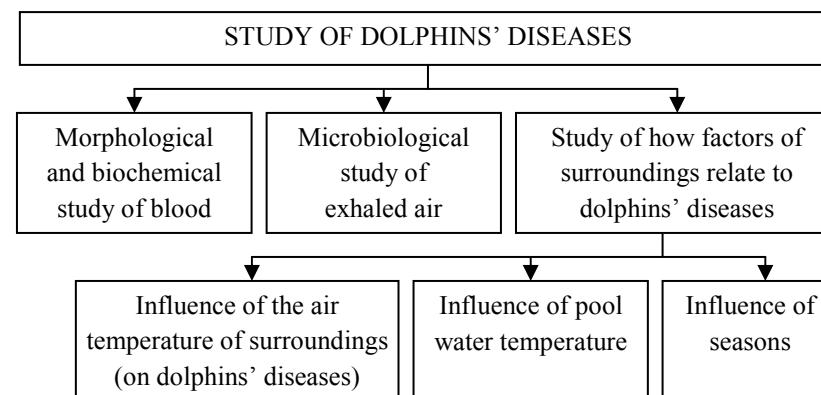
The study was carried out in the Lithuanian Maritime museum, in the Pathology Centre of the Lithuanian Veterinary Academy (Lithuanian Health Science University since 2010) from 1996 till 2010. 21 Black sea dolphins (*Tursiops truncatus ponticus*) were included in the study.

The study was carried out in three stages.

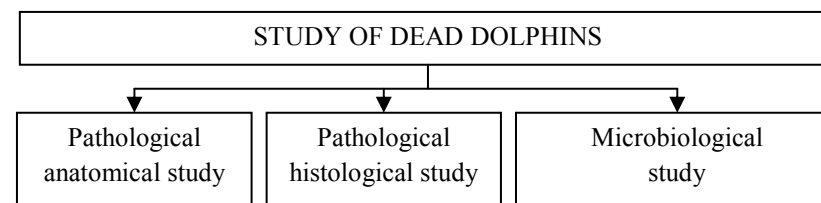
STAGE 1



STAGE 2



STAGE 3



Investigation scheme

Identification of dolphins' normal physiological and hematological blood values with regard to age and sex

The research was carried out in the Lithuanian Maritime museum for 8 years from 2003 till 2010 constantly observing dolphins' adaptation, the curve of their growth and development. According to the protocol of health watch blood samples for assessment of morphological and biochemical indices were drawn periodically. Only samples of 8 clinically healthy dolphins were used for study. During the growth period, the samples of the same dolphins' blood were attributed to two or three age groups. The animals were not given any food 12–14 hours before drawing blood samples. The samples were drawn in the mornings from 8:30 till 10:30, according to their age bracket and it was done in all seasons. With regard to age, the blood taken from males was attributed to two age groups whereas the females' blood was attributed to three age groups. Blood was not drawn from healthy males before they had aged two. As a result, the dolphins were put into five groups according to their age and sex. Males aged 2–5 were put into group 1 (n=45 blood samples); males over 5 years old were put into group 2 (n=34 blood samples); group 3 – females aged under two (n=13 blood samples); group 4 – dolphin females aged 2–5 (n=29 blood samples); group 5 – females over 5 years old (n=83 blood samples).

Morphological indices of dolphins' blood were analyzed by use of Cell-Dyn 1700 (Abbott, USA, 2005) and Cell-Dyn Ruby (Abbott, USA, 2007) analyzers. The taken blood smears were dyed with Gimza dye (Merck, Germany) and assessed using a microscope (Nikon instruments, Japan) that magnifies 50 times. Biochemical indices of dolphins' blood were obtained by use of analyzers RX Daytona TM (Randox, UK, 2006) and Vitros 250 (Ortho Clinical Diagnostic, Janson & Janson, USA, 2002). The values of potassium, calcium and chlorine were assessed by use of Ilyte analyzer (Instrumentation laboratory SpA, USA, Italy, 1994), the value (amount) of fibrinogen was obtained by use of STA compact analyzer Stago (France, 2004). The erythrocytes sedimentation rate was carried out in the Lithuanian Maritime museum, in the laboratory of the dolphinarium. Dolphins' blood samples were drawn by use of "Venoject" 2.4 mL vacuum test tubes (from the firm "Terum") with sodium citrate inside and the blood samples were estimated according to Westergren's methodology of study.

Identification of the effects of pool sizes on the respiratory rates of females and calves and their behavior during the postnatal period

In the Lithuanian Maritime museum 6 female dolphins and their calves were being observed for a month after birth. The females and their calves' breath rate were counted once at the beginning of every hour. The breath

rate was calculated by averaging out the number of breaths over a minute, i.e. t/min. The same three females No 7, No 8 and No 5 gave birth to calves No 7–1, No 8–1 and No 5–1 respectively in a smaller specially prepared pool, being separated from other dolphins. Then the same females gave birth to their calves No 7–2, No 8–2 and No 5–2 being in the bigger pool together with other dolphins of different age and sex. In both of the pools the animals were kept under observation for 30 days after birth and were observed round the clock.

Identification of the diseases affecting dolphins and the frequency of their occurrence

9 dolphins' clinical data of laboratory tests run from 1996 till 2010 were used in the study to identify the forms of diseases and their frequencies. The beginning of diseases and their length in days were recorded. The diseases were diagnosed. The cases when the disease was not diagnosed due to not clearly expressed clinical signs of one or another disease, when laboratory tests were not informative enough but the dolphins were apathetic or there were behavioral disorders were also included in the study. The season when the dolphins fell ill, the temperature of the water in the pool and the air temperature of the surroundings were recorded.

The microorganisms of the air exhaled by the dolphins were examined. The frequency of how often the microorganisms were cultured with regard to the season and the diagnosis of the disease were identified. The training methods for veterinary procedures were used to take samples of the exhaled air. The trainers gave command to the dolphins to swim to the side of the pool, and then they ordered the dolphins to exhale the air heavily twice. After that asepsis round the blowhole was done using the preparation "Bode sterilium" (Bode chemie Hamburg, Germany). Then again according to the command the dolphins breathed out the air onto the Petri dishes with differential selective diagnostic media.

Evaluation of morphological and biochemical parameter changes in dolphins' blood with regard to the disease

The study was conducted in the dolphinarium of the LMM in 2003–2010. Blood samples of 8 dolphins that were ill and their clinical symptoms were being observed were used in the study. Blood samples of 3 males and 5 females were used in the study. The animals had not been fed for 12 hours before their blood was drawn. It was done in the morning from 8:30 till 10:30 on the first day of illness. According to the clinical symptoms of the disease and the results of blood tests, the illness was diagnosed.

The changes in blood analytes were determined taking into consideration

the diagnosis of the disease. The conditions in which the dolphins were kept, the way the blood was drawn and delivered to the laboratory as well as the technique of running blood tests were identical to the ones used for testing healthy dolphins' blood.

Pathological-morphological investigation

From 1996 till 2010 in the Pathology Centre of the Lithuanian Veterinary Academy (VA LHSU since 2010) the testing of 8 Black sea dolphins that had died in the dolphinarium of the LMM and 2 calves that were born dead was carried out in order to find out the cause of death.

The data of the history of dolphins' diseases were recorded in the LMM patients' register. Necropsy was carried out on the dead animals in the Pathology Centre of the LVA 6–8 hours after dolphins' death.

Pathological-histological investigation

Fixed pathological specimen was cut in the preparatory laboratory, placed into a biopsy cassette and dipped in cold running water for 24 hours so that 10 % formalin was swilled out of it (pathological specimen).

The pathological specimen was processed in a tissue immerse processor (Shandon Pathcentre, USA). Within 2–3 hours the pathological specimen in biopsy cassette was dehydrated in 60, 80 and 96 % ethyl alcohol, and also processed for 1–3 hours in isopropyl alcohol. Later on the pathological specimen was cleared in chloroform for 1–3 hours. After dehydration and clearing, it was impregnated with paraffin by use of the tissue embedding system TES 99 (USA).

The paraffin block with the pathological specimen inside was chilled so that the material would acquire the required solidity. Then it was sectioned with rotary microtome Leica RM2235 or Shandon Finesse (USA), microtome knives were used too. The cut section 4 µm in thickness was taken into a 37 °C thermostatic water bath and the cut was flattened by use of needles. After the flattening process in the bath had been completed, the cut sections were put on the objective slide. The slide with the cut section was placed on the thermo hotplate (Thermo Scientific Hotplate, USA) which had the temperature of 37 °C then the slides with the cut sections were placed into the thermostat and kept there for 24 hours in the temperature of 37 °C.

The histological sections were stained with hematoxylin eosin (HE), the Red Sirius. The results were assessed by use of light microscope that magnifies 40–400 times.

Isolation of microorganisms from study samples

Samples from the dead dolphins' blowhole, trachea, bronchi, lungs and sinuses as well as intestine were taken for microbiological testing by use of swabs. The samples of purulent exudation were taken for testing from the 8 months old calf's, born to Glorija, broken lower jaw. Those samples were kept and transported in the "Amies" medium with carbon (Cultiplast, Milan, Italy) in the surroundings with temperature 10–20 °C. Bacteria were cultivated in special differential-diagnostic, selective media such as blood, MacConcey, chocolate and Mannitol salt agar. Sabouraud medium (Oxoid, England) was used to examine microscopic fungi.

Statistical analysis

The data is provided as average of at least three independent experiments, with the standard calculation error. Validity of the change of data was assessed using the odd experiment two deviation Student t-test. The data was processed using Microsoft Office Excel 2003 software. The data is considered to be valid when P is $<0.05^*$; $-P<0.05^{**}$; $-P<0.01$; $***-P<0.001$.

To conduct the statistical analyses, the tools of Microsoft Excel were used. The characteristics of histograms (excess Ex and asymmetry As) have been calculated using the third and fourth line central moments. It has been accepted, that excess is insignificant when $Ex<0.5$, and when $Ex>1.0$, it is considered that the excess is significant. It is considered that histogram is symmetric when $As\leq 0.25$. The asymmetry is considered to be significant when $As\geq 0.5$. The correlation between the two compared lines is considered to be strong if the coefficient is $r\geq 0.5$. The differences are considered to be significant when comparing the zero hypothesis, the importance of the Student's criterion was $P<0.05$. The results are provided mean with the standard deviation ($M\pm SD$).

RESULTS OF THE INVESTIGATION

Identification of normal physiological and hematological parameters of dolphins' blood with regard to age and sex

The blood morphological parameters of *Tursiops truncatus ponticus* male and female dolphins' are presented in Table 1. There were on average $(6.77\pm 1.54) \times 10^9/L$ leucocytes in the blood of *Tursiops truncatus ponticus* dolphins' that were kept in the dolphinarium of the Lithuanian Maritime museum. The number of leucocytes in the blood of 2–5 year old male and female dolphins did not differ, but it was smaller from 10.9 % ($P<0.05$) to 20.1 % ($P<0.001$) than in the blood of younger and older dolphins.

The average number of erythrocytes in dolphins' blood was $(3.91 \pm 0.49) \times 10^{12}/L$. It did not differ with regard to sex for the age group 2–5, but for the group older than 5, the number of erythrocytes in males' blood was 5.6 % ($P < 0.05$) greater than in females'. In females' under 2 blood there were 11.0–12.6 % ($P < 0.01$) more erythrocytes than in the blood of older females. The average number of immature erythrocytes, known as reticulocytes, was 2.40 ± 1.14 %. The average concentration of hemoglobin in dolphins' blood was 161.2 ± 12.3 g/L. The hemoglobin concentration in females' blood did not depend on age whereas in the over 5 year old males' blood an average amount of hemoglobin was 12.4 g/L (7.2 %, $P < 0.01$) bigger compared to the younger males' and 14.6 g/L (8.4 %, $P < 0.01$) compared to the hemoglobin concentration in the blood of females that were of the same age.

The average erythrocyte sedimentation rate in the blood from the dolphins kept in the LMM dolphinarium was 2.0 ± 0.5 mm/h and did not depend on animals' age or sex.

Since the number of leucocytes, the hemoglobin concentration and hematocrit value parameters were distributed in a normal pattern, it is possible to make an assumption that their average values and differences between sexes and age groups are characteristic of the entire *Tursiops truncatus ponticus* dolphin population. The other average blood values that were studied revealed only the peculiarities of the individuals from the dolphin group that is kept in the LMM dolphinarium.

During the analyses of the leukocyte formula in dolphins' blood it was determined that segmented neutrofiles in *Tursiops truncatus ponticus* blood made up 52.1 ± 8.5 % of all leucocytes on average. In females' under 5 blood the average number of segmented neutrofiles was 11.1–12.0 % ($P < 0.01$) smaller than in the blood of older females. The difference of this value among the males from different age groups made up 4.0 %, ($P < 0.05$). In the blood of the male dolphins aged over 5 the determined number of band neutrofiles was 1.3 % ($P < 0.01$) bigger. In the blood of females of the same age the determined number of eozinofils was 5.0–6.3 % ($P < 0.01$) bigger compared to the findings in the age group under 2.

The average number of lymphocytes in *Tursiops truncatus ponticus* dolphins' blood was 20.9 ± 10.0 % (of the total number of leucocytes). The number of lymphocytes in the blood of females under 5 was 18.4–19.9 proc. ($P < 0.01$) bigger than in the older animals' blood. The difference among the males from different age groups was 5.5 % ($P < 0.01$) respectively.

Table 1. Healthy dolphins' *Tursiops truncatus ponticus* blood hematological parameters

Parameters	Males		Females		
	2–5 years old M±SD	> 5 years old M±SD	under 2 years old M±SD	2–5 years old M±SD	> 5 years old M±SD
Leucocytes, $10^9/L$	$6.10 \pm 1.42^*$	$6.85 \pm 1.38^{**}$	7.73 ± 1.00	$6.18 \pm 1.58^*$	$7.17 \pm 1.530^{**}$
Erythrocytes, $10^{12}/L$	$3.79 \pm 0.49^{**}$	$4.06 \pm 0.50^{**}$	4.39 ± 0.41	$3.91 \pm 0.45^{**}$	$3.83 \pm 0.47^{**}$
Reticulocytes, %	3.0 ± 1.3	2.3 ± 0.8	3.2 ± 0.7	2.3 ± 0.7	2.0 ± 1.1
Hemoglobin, g/L	161.2 ± 12.4	$173.7 \pm 8.7^{**}$	153.7 ± 6.2	158.3 ± 7.2	$159.0 \pm 12.9^{**}$
Hematocrit, %	$42.5 \pm 5.0^*$	$44.9 \pm 4.6^{**}$	43.9 ± 3.3	$42.0 \pm 4.18^{**}$	$42.3 \pm 4.2^{**}$
Erythrocyte sedimentation rate, mm/h.	2.0 ± 0.1	2.0 ± 0.1	1.7 ± 0.0	2.0 ± 0.0	2.0 ± 0.0
Eozinofils, %	21.1 ± 5.0	$20.8 \pm 4.4^{**}$	15.4 ± 2.6	16.7 ± 4.6	$21.7 \pm 6.3^{**}$
Band neutrophils, %	2.0 ± 1.6	$3.4 \pm 2.3^{**}$	1.8 ± 1.2	$2.3 \pm 1.3^{**}$	2.8 ± 2.3
Segmented neutrofiles, %	$48.9 \pm 6.2^{**}$	$52.9 \pm 6.6^{**}$	46.2 ± 6.8	$45.3 \pm 9.0^{**}$	$57.3 \pm 7.0^{**}$
Lymphocytes, %	$23.7 \pm 6.0^{**}$	$18.3 \pm 7.0^{**}$	33.6 ± 6.7	$32.1 \pm 9.4^{**}$	$13.7 \pm 6.0^{**}$
Monocytes, %	4.2 ± 2.2	4.8 ± 2.1	3.2 ± 1.7	3.2 ± 1.8	3.9 ± 2.2

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ – Comparison of males and females blood parameters with regard to age

The biochemical parameters of blood of the dolphins of different sex and different age groups are shown in Table 2. The average amount of urea in the *Tursiops truncatus ponticus* dolphins' blood was 16.74 ± 2.62 mmol/L. In the age group 2–5 the amount of urea in both males and females blood was 10.8 ($P < 0.01$) – 16.1 % ($P < 0.01$) larger compared to the younger and older animals. The average amount of creatinine in the dolphins that are kept in LMM dolphinarium blood was 131.18 ± 28.80 mmol/L.

Table 2. **Healthy dolphins' blood hematological parameters**

Parametres	Males		Females		
	2–5years old M±SD	> 5 years old M±SD	under 2years old M±SD	2–5 years old M±SD	> 5 years old M±SD
Urea, mmol/L	18.28± 3.36*	15.35± 1.95	15.92± 2.31	17.84± 1.90*	16.06± 2.01
Creatinine, µmol/L	138.4± 15.9	157.7± 49.4**	112.3± 9.2	119.2± 13.4**	125.0± 22.9
Aspartate aminotransferase, U/L	256.1± 75.2**	250.3± 36.1	185.2± 70.1	231.2± 48.0**	212.0± 54.1
Alanine aminotransferase, U/L	49.6± 39.0	48.3± 13.3*	32.7± 12.9	38.1± 8.7	27.7± 14.1*
Gamma- glutamyl transferase, U/L	42.42± 13.0	47.34± 9.3*	36.81± 10.6	42.86± 6.7	50.79± 10.1*
Alkaline phosphatase, U/L	1550.9± 347.6*	813.5± 53.1**	1471.1± 620.8	1736.3± 364.7*	675.4± 318.6**
Laktatdehydrogenase, U/L	829.7± 84.3*	767.1± 65.5**	806.5± 85.8	808.8± 73.2*	750.3± 135.6**
Sodium, mmol/L	156.01± 1.47	156.75± 1.19	156.06± 1.39	155.64± 3.31	157.32± 1.78
Potassium, mmol/L	3.57± 0.30	3.34± 0.26	3.54± 0.20	3.52± 0.24	3.30± 0.26
Chlorine, mmol/L	119.49± 1.82	117.72± 2.06	117.00± 1.76	119.41± 2.31	119.56± 2.42
Iron, µmol/L	26.66± 7.24**	24.71± 3.60	35.16± 10.86	29.11± 6.30**	27.41± 5.89
Glucose, mmol/L	5.10± 0.78	4.87± 0.58	5.84± 0.71	5.43± 0.65	4.69± 0.65

*P<0.05, **P<0.01 – Comparison of males and females blood parameters with regard to age

For none of the female groups the difference in the amounts of creatinine was observed, however, the amount of creatinine in the blood from males' over 5 was 12.3 % (P<0.05) larger than in the younger animals' blood. There was almost no difference observed when the aspartate aminotransferase activity was compared regarding the dolphins' age and sex. Only in the females' aged under 2 blood it was 45.95 U/L (19.9 %,

P<0.05) lower compared to the one in the blood from the older females. No difference in the amount of the enzyme gamma-glutamyl transferase in the males' blood regarding their age was observed whereas in the females' blood it constantly increased and in the older than 5 females' blood it was 27.5 % (P<0.01) higher than in the females' under 2 blood. Of all ferments only the ones of lactatdehydrogenase activity were distributed in normal pattern with no display of considerable excess or asymmetry (As=0.18; Ex=0.74).

The amount of iron found in females' under 2 blood was from 17.2 (p<0.05) to 22.0 (p<0.01) per cent larger than in the blood from older females.

Influence of pool sizes on the respiratory rate and behaviour of dolphin females and calves during the postnatal period

The aim of the study was to ascertain in what conditions the females should be kept so that more of the calves that are born would survive. There is no unanimous opinion whether it is better to separate the females from the other dolphins of the group and let them calve on their own, to keep them and their calves separated from other dolphins for some time (for a month or longer) or to let them calve in the same pool with the other dolphins of the group. To identify the possible advantages and disadvantages of the ways of keeping mentioned above the research was conducted in the Lithuanian Maritime museum. The calves' born to the same females respiratory rate, which reflects how intensively the animals move during the postnatal period in different size pools, was analyzed.

The histograms of respiratory rate of females and their one month old calves kept in the bigger pool perfectly match the normal pattern ($E_x = 0.12 < 0.2$; $A_s = 0.12 < 0.25$) and ($E_x = 0.48 < 0.5$; $A_s = 0.38 < 0.5$, respectively). It may be assumed that the conditions which influence the respiratory rate of the females with one month old calves in this pool are the same as those that are usual for the population.

The histograms of respiratory rate of females and their one month old calves kept in the smaller pool showed a considerable difference from the normal pattern: females ($E_x = 1.02 > 1.0$; $A_s = 0.71 > 0.5$) and calves – ($E_x = 1.26 > 1.0$; $A_s = 0.38 < 0.5$, respectively). Due to the fact that the dolphin groups kept in the bigger and smaller pools were identical, it may be judged that the conditions which influence the females and their calves' under one months old respiratory rate differed considerably in this pool from the ones that are usual for the population as well as from those in the bigger pool.

During the entire period of observation the females' respiratory rate in the smaller pool fluctuated between 1.2 and 4.8 per minute and was 15.4 % ($P < 0.01$) higher than in the bigger pool. Females' respiratory rate in the bigger pool fluctuated between 1.0 and 3.3 times per minute. On average in the smaller pool the females breathed 2.4 ± 0.5 times per minute and 2.1 ± 0.4 t/min in the bigger one.

In the smaller pool the calves breathed between 1.2 and 6.2 times per minute, the average frequency 2.9 ± 0.7 , i.e. 21.7 % ($P > 0.01$) more often than in the bigger pool where they breathed between 1.1 and 4.6 t/min and the average respiratory rate was 2.4 ± 0.4 t/min.

In accordance with Pearson's correlation coefficient the dependence of dolphins' respiratory rate on the time of observation is best approximated by the logarithm function. During the first week after calving the females' breath rate in most cases notably changes and during the remaining weeks of observation almost reaches the normal value. Immediately after calving the nature of change of different females' respiratory rate differs (increases, decreases or almost does not change) but is similar in the pools of different size.

During the first month after birth the calves' respiratory rate is closely related to their mothers' respiratory rate. In the bigger pool the correlation coefficient $r = 0.72 - 0.74$ and in the smaller pool $r = 0.59 - 0.76$.

No dependence on the time of the day was identified either during the first week after birth or during the remaining time of a month-long observation in any of the pools. It was observed that for the females and calves it is easier to move in bigger pools with slighter angles at turns. During the first week after birth the calves found it harder to turn in the corners and the females found it harder to look after the calves. It was also observed that in the smaller pool the calves bruised the front of the lower jaw against the wall of the pool more often whereas in the bigger pool no such injury was observed. The animals stayed longer on the surface of the water and breathed more frequently.

The diseases affecting dolphins and the frequency of their occurrence

Dolphins, which are kept in the LMM dolphinarium, were diagnosed with the inflammation of respiratory organs: bronchitis and bronchopneumonia. Bronchitis was recorded in 62.1 % of cases and bronchopneumonia in 27.1 %. The overall number of respiratory organ diseases made up 89.2 % of all studied diseases (Fig. 1).

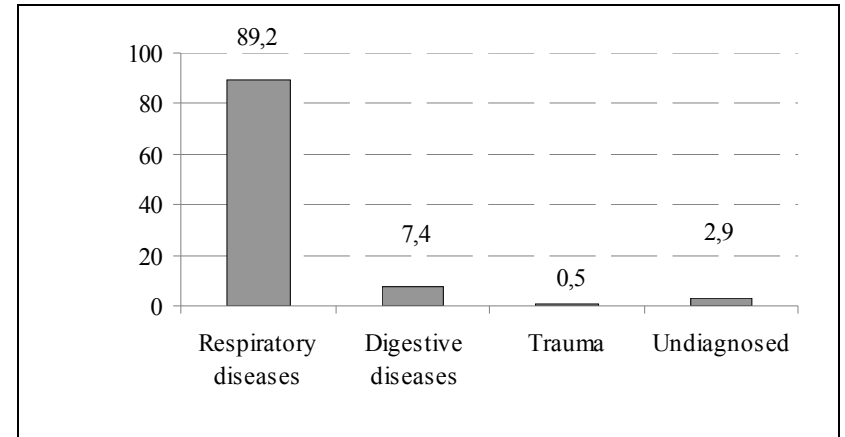


Fig. 1. The percentage distribution of diseases in examined dolphins

Seasonal relationship to the microorganisms isolated from the exhaled air of sick dolphins

In 2/3 (69.6 %) cases in the samples from the air exhaled by the sick dolphins *Enterococcus* spp., *Morganella morganii*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* or *Shewanella putrefaciens* in their pure form or associated bacteria medium, pathogenic *Candida albicans* yeast were found. The prevailing bacteria (21.7 % of cases) are more frequently found in spring, whereas in summer they were found less often (13.3 % of cases).

The dolphins suffered from bronchitis with almost the same frequency in all seasons (Fig. 2), but the largest number of cases of bronchopneumonia was diagnosed in spring (34.0 % of cases) (Fig. 3). The highest number of cases of gastroenteritis was diagnosed in autumn (Fig. 4).

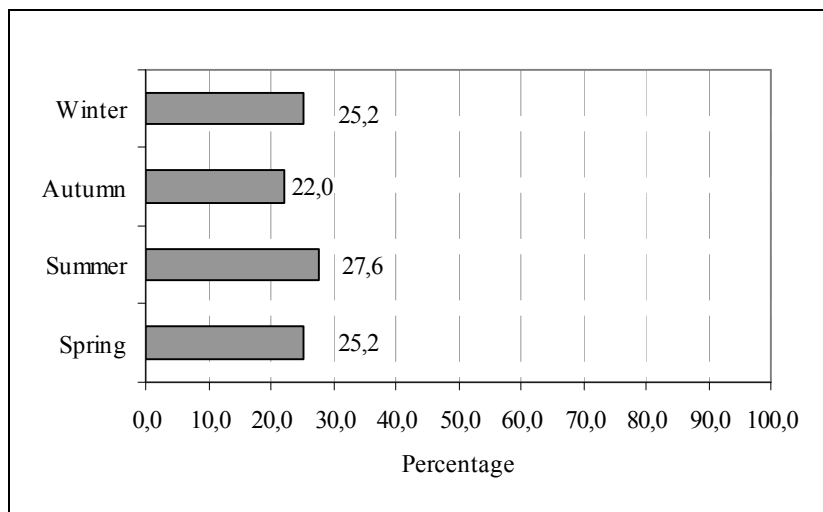


Fig. 2. Percentage distribution of bronchitis throughout the year

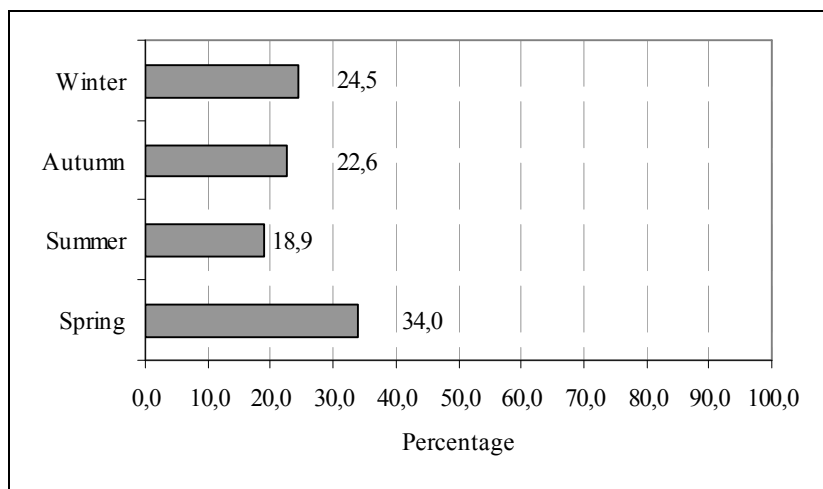


Fig. 3. Cases of pneumonia throughout the year

The highest number of cases of gastroenteritis was diagnosed in autumn (Fig. 4).

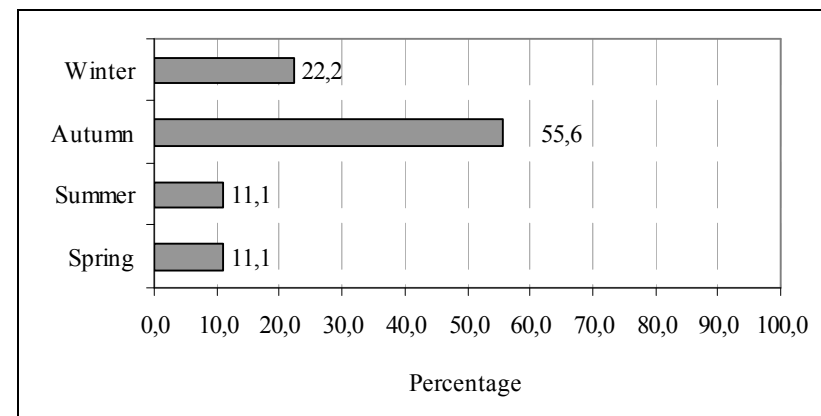


Fig. 4. Seasonal relationship to the number of dolphins suffering from gastroenteritis

Morphological and biochemical changes of dolphins' blood, related to disease

The changes in erythrocyte sedimentation rate

In cases of certain diseases, the erythrocyte sedimentation rate in sick dolphins', kept in the LMM dolphinarium, blood was between 2.2–12.1 times higher ($P < 0.01$) than in healthy dolphins' blood. However, the differences of the dispersals of this parameter were of the same line.

When dolphins were ill with bronchitis, the erythrocyte sedimentation rate was directly correlated with the increase in the number of monocytes in blood ($r = 0.53$), whereas when they had bronchopneumonia – with the decrease of the number of eosinophiles ($r = -0.52$). When they had hepatitis, erythrocyte sedimentation rate was growing higher while the number of reticulocytes was decreasing ($r = -0.66$).

The changes of the amount of hemoglobin

The average of hemoglobin amount in the blood of dolphins', kept in the LMM dolphinarium, that were ill with hepatitis or bronchopneumonia was between 5.4–41.6 % lower ($p < 0.01$) than healthy dolphins'. No statistical difference was found in the amount of hemoglobin from sick and healthy dolphins when the animals suffered from bronchitis or gastroenteritis ($P = 0.113–0.776$).

The changes of overall number of leucocytes

The average of leucocytes number in the blood from dolphins that were ill with bronchitis or bronchopneumonia was 40.7–78.4 % higher ($P<0.01$) than in healthy dolphins' blood. However, when the animals fell ill with gastroenteritis or hepatitis, the numbers of leucocytes statistically did not differ from the ones in healthy dolphins ($P=0.095$ and $P=0.107$, respectively).

Changes in the counts of segmented neutrophils

The average counts of segmented neutrophils in the blood from the dolphins sick with bronchitis, bronchopneumonia or hepatitis were between 5.5–18.5 % ($P<0.01$) higher than in healthy dolphins. Moreover, in the case of bronchitis there is a likelihood of such tendency in the entire population of *Tursiops truncatus ponticus* ($Ex=-0.87$, $As=-0.18$). No statistical difference was found in the count of segmented neutrophils from sick and healthy dolphins when the animals suffered from gastroenteritis ($P=0.113-0.776$). The counts of segmented neutrophils in the blood from sick dolphins grows higher whereas the number of lymphocytes decreases ($r=-0.66-0.98$), irrespective of the disease.

Changes in the counts of band neutrophils

The average counts of band neutrophils in the blood from the dolphins sick with bronchitis, bronchopneumonia were between 0.8–3.5 % higher ($P<0.05$ and $P<0.01$, respectively) higher than in healthy dolphins.

Changes in the level of eosinophils

The average levels of eosinophils in the blood from the dolphins that were kept in the LMM dolphinarium and sick with bronchitis, bronchopneumonia, gastroenteritis or hepatitis were between 2.6–14.2 % ($P<0.01$) lower than in healthy dolphins.

Changes of the number of lymphocytes

The average of lymphocytes number in the blood from dolphins that were ill with bronchitis, hepatitis or bronchopneumonia was 5.2–10.8 % lower ($P<0.01-0.05$) than in healthy dolphins. No statistical difference was found in the number of lymphocytes in the blood from sick and healthy dolphins when the animals suffered from gastroenteritis ($P=0.481$).

Changes of the number of monocytes

The average of monocytes' number in the blood from dolphins that were ill with bronchitis and bronchopneumonia was 1.4–1.5 % higher ($P<0.01$)

than in healthy dolphins. No statistical difference was found in the number of monocytes in the blood from sick and healthy dolphins when the animals suffered from gastroenteritis and hepatitis ($P=0.256$ and $P=0.662$, respectively).

Change of the amount of urea

The average of the amount of urea in the blood from dolphins that were ill with gastroenteritis was 14.6 % smaller than in healthy dolphins' blood. No statistical difference was found in the amount of urea in the blood from sick and healthy dolphins when the animals suffered from bronchitis, bronchopneumonia and hepatitis ($P=0.255-0.484$).

Change of the amount of creatinine

The average of the amount of creatinine in the blood from dolphins that were ill with hepatitis was 36.1 % smaller ($P<0.01$) than in healthy dolphins' blood. No statistical difference was found in the amount of creatinine in the blood from sick and healthy dolphins when the animals suffered from bronchitis, bronchopneumonia and gastroenteritis ($P=0.323-0.720$).

Change of the amount of bilirubin

The average of the amount of total bilirubin in the blood from dolphins that were ill with bronchitis or bronchopneumonia was 39.7–48.6 % larger ($P<0.05$) than in healthy dolphins' blood. No statistical difference was found in the amount of bilirubin in the blood from sick and healthy dolphins when the animals suffered from gastroenteritis ($P=0.888$ and $P=0.066$, respectively).

Change of the amount of glucose

The average of the amount of glucose in the blood from dolphins that were ill with bronchitis or gastroenteritis was between 6.44–27.3 % larger ($P<0.01$ and $P<0.05$ respectively) and in the case of hepatitis 31.9 % smaller ($P<0.05$) than in healthy dolphins' blood. No statistical difference was found in the amount of glucose in the blood from sick and healthy dolphins when the animals were ill with bronchopneumonia ($P=0.076$).

Change of the amount of iron

The average amount of iron in the blood of dolphins, kept in the LMM dolphinarium, that were ill with bronchopneumonia or gastroenteritis was between 24.6–32.3 % lower ($P<0.01$ and $P<0.05$, respectively) than in healthy dolphins.

Change of the amount of potassium

The average amount of potassium in the blood of dolphins, kept in the LMM dolphinarium, that were ill with bronchopneumonia, gastroenteritis or hepatitis was between 3.0–12.3 % higher ($P<0.05$; in the case of hepatitis $P<0.01$) than in healthy dolphins. There is a likelihood of such tendency in the entire population of *Tursiops truncatus ponticus* ($Ex=0.52$, $As=-0.15$) if dolphins were ill with bronchopneumonia. No statistical difference was found in the amount of potassium in the blood from sick and healthy dolphins if the animals suffered from bronchitis ($P=0.122$).

Change of the amount of sodium

The average amount of sodium in the blood of dolphins that were ill with bronchopneumonia or gastroenteritis was between 1.1–2.7 % lower ($p<0.01$) than in healthy dolphins. No statistical difference was found in the amount of sodium in the blood from sick and healthy dolphins if the animals suffered from bronchitis or hepatitis ($P=0.434$ and $P=0.230$, respectively).

Changes of the amount of lactatdehydrogenase (LDH)

The average amount of LHD in the blood of dolphins, kept in the LMM dolphinarium, that were ill with bronchitis, bronchopneumonia or hepatitis was between 15.0–48.6 % higher ($P<0.01$), in the case of gastroenteritis it was 11.6 % lower ($P<0.05$) than in healthy dolphins.

Changes of the amount of alkaline phosphatase (ALP)

The average amount of ALP in the blood of dolphins that were ill with bronchitis, bronchopneumonia or hepatitis was between 27.9–47.6 % lower ($P<0.01$) than in healthy dolphins. In the case of hepatitis ALP was not that low – 27.9 % ($P<0.05$).

Gamma glutamyl transferase (γ GT)

The average number of γ GT in the blood of dolphins that were ill with bronchopneumonia or hepatitis was between 1.94–5.92 times larger ($P<0.01$) than in healthy dolphins. If the dolphins were ill with gastroenteritis, the average number of γ GT in the blood of sick dolphins was 29.6 percent smaller ($P<0.01$) than in healthy dolphins.

No statistical difference was found in the number of γ GT in the blood from sick and healthy dolphins if the animals suffered from bronchitis ($P=0.137$).

Alaninaminotransferase (ALT)

The average number of ALT in the blood of dolphins that were ill with bronchitis or bronchopneumonia was from 27.9 % to 2.72 times larger

($P<0.01$) than in healthy dolphins. In the cases of gastroenteritis or hepatitis the number of ALT in the blood of healthy and sick dolphins displayed a considerable difference ($P=0.271$ and $P=0.659$ respectively).

Aspartataminotransferase (AST)

The average number of AST in the blood of dolphins that were ill with bronchitis, bronchopneumonia or hepatitis was between 15.2–88.4 % larger ($P<0.01$) than in healthy dolphins, whereas if the dolphins were ill with gastroenteritis, it was 19.0 percent smaller ($P<0.05$).

Change of the amount of fibrinogen

The average number of fibrinogen in the blood of dolphins that were ill with bronchitis, bronchopneumonia or gastroenteritis was from 52.0 % to 1.4 times higher ($P<0.01$) than in healthy dolphins, in the case of hepatitis – 37.7 % lower ($P<0.05$).

Identify the causes of death through pathological, anatomical, histopathological and microbiological examinations

The study analysis showed that the majority of dolphins (62.5 %) died from acute and chronic inflammations of respiratory organs. There were 25 % of deaths from inflammation of intestines and stomach. 12.5 percent of deaths were caused by traumas. From all the calves 2 were calved dead.

During the study period one calf was calved dead and the other was born premature due to the miscarriage. The dead calf was diagnosed with atelectasis and hyperemia of lungs. Stomach and small intestine bleeding was determined during the examination of the dead prematurely born 8 month-old calf. Histological examination showed that there were bleeds in liver, kidneys and spleen.

A six-year old male named Tafis was treated with antimicrobial drugs because he had lost appetite. He died suddenly. Pathological changes were characteristic of acute inflammation of respiratory organs. Histological examination conducted, it was determined that he was ill with acute purulent bronchitis and inflammation of the lungs. Antibiotics were administered to the six-year-old male named Tedis after it had been determined that he had an increased respiratory rate. The histological examination showed that he suffered from bronchitis and bronchiolitis, minimal alveolar fibrosis and infiltration of lymphatic cells.

The 21-year-old male, Romas by name, was treated for inflammation of respiratory organs. Pathological changes were characteristic of obstructive inflammation of the lungs. After histological examination it was determined bronchitis and bronchiolitis, alveolar epithelial cell proliferation and infiltration of lymphatic cells.

The female Nana, approximately 35 years of age, was treated for inflammation of respiratory organs. Histological study conducted, it was determined that she was ill with bronchitis and bronchiolitis, pulmonary alveolar microlithiasis, alveolar fibrosis and atelectasis as well as degeneration of the liver cells and centrilobular hemorrhagic necrosis and inflammation of the liver, minimal degeneration of cortical tubular layer and atrophy of glomerulus.

The male dolphin Orfejas was treated with antimicrobial drugs. The pathological changes were characteristic of inflammation of intestines and stomach and the granulomatous inflammation of fundic chamber of the stomach. Histological study conducted, it was determined that she had minimal atrophy of the gastric glands alongside with granulomatous inflammation of fundic chamber of the stomach.

The change in the behavior of a 14-month-old female calf born to Glorija was observed early in the morning. The animal was apathetic and did not consume food. Antimicrobial drugs were administered to her. However, the development of the disease was fast and she died the same day. During the autopsy pathological changes characteristic of the inflammation of intestines and stomach were found. Histological examination conducted, it was determined that she had minimal degeneration of intestinal villi and the inflammation of mucous membrane of the stomach and small intestines. When the examination of the pathological specimen was carried out, the pathogen of erysipelas was isolated.

In the air exhaled by a 14-year-old female Nika *Candida albicans* and *Candida tropicalis* pathogenic yeast as well as *Shewanella putrefaciens* and *Enterococcus* bacteria were found. The female had been treated for the infection of pathogenic yeast for 48 days but since her health was getting worse antimicrobial drugs were administered. Pathology anatomical examination conducted, it was determined that she suffered from necrotic purulent inflammation of sinuses. During the histological study of the hemorrhagic specimen from the tissue of sinuses, microscopic hives of fungi were found. *Candida albicans* pathogenic yeast was found during the microbiological study of the specimen from the tissue of sinuses.

Glorija's 8-month-old calf unexpectedly became passive and died suddenly. During the examination of the dead calf the fragmental fracture of the lower jaw, purulent inflammation of the broken bone and soft tissues, focal purulent inflammation in the right kidney and heart muscle (abscesses 0.5–2 cm in diameter), cyst in the right kidney, enlarged spleen and degeneration of liver were diagnosed. *Staphylococcus aureus* bacteria were isolated during the bacteriological study.

DISCUSSION

The average of 3.9×10^{12} /L erythrocytes and 2.4 % of reticulocytes were found in the blood of the dolphins of both sexes and all age groups, which were kept in the LMM dolphinarium. It was determined that the greatest number of erythrocytes and the highest concentration of hemoglobin were in the blood from males aged over 5. The same results were determined in the grown up dolphins' blood by T. S. Venn-Watson and others (2007). S. R. Noren and other researchers (2002) determined that erythropoiesis goes on faster in the organism of dolphins aged over 3.

It was determined that the number of leucocytes in the blood from 2–5 year-old males was 10.95 % smaller than in the group of older dolphins. The number of leucocytes in the blood from 2–5 year-old females was found to be 20.05 % smaller compared to the findings in the blood from younger ones and 13.80 % smaller compared to the older ones.

The number of segmented neutrophils found in the blood from males aged over 5 was 7.56 % greater than in the younger males' blood. The number of segmented neutrophils found in the blood from females aged over 5 was between 19.37–20.94 % greater compared to the findings in the younger age groups. In reference it is also indicated that the number of segmented neutrophils in older dolphins' blood increases (Venn-Watson et al., 2011).

The number of eosinophils found in the blood from females aged over 5 was 29.03 % greater than in the age group of females under 2. Between the older and younger male groups only 1.42 % difference in this parameter was found. The determined number of eosinophils in the blood from the dolphins kept in the LMM was 15.40–21.70 %. The researchers who studied the Atlantic afalins' blood found only 10.00–11.00 % of eosinophils (Shirai, Sakai, 1997; Bossart et al., 2001). Similar results regarding this parameter were obtained by the researchers who studied other Black sea afalins kept in dolphinarium (Andreeva et al., 2007).

The increase or decrease of the activity of the enzyme ALP may be a very important diagnostic or prognostic parameter to assess dolphins' health (Romano et al., 2004). In accordance with the results obtained through our research we may maintain that the activity of the enzyme ALP differed considerably in different age groups. The greatest numbers were found in the blood from the youngest group of dolphins. The activity of the activity of the enzyme ALP found in the blood from older dolphins was two times lower.

Similar results regarding this parameter were obtained by the researchers from other countries who did research on the blood parameters in Atlantic

afalins (Goldstein et al., 2006; Venn-Watson et al., 2007). M. B. Fothbergill and other researchers (1991) argued that the elevated alkaline phosphatase elevates when an animal grows and the skeleton is forming.

In the majority of dolphinariums constant observation of females is started two or three weeks before calving and after a calf is born it is continued alongside with the observation of the calf. During the observation period the females and calves' respiratory rate and synchronicity, the proximity of suckling the calves as well as frequency of suckling, periods of games and rest can be evaluated. In addition, various peculiarities of the female and calf's behaviour: care after the calf, activity of both the female and the calf, the increase in calf's body mass are observed (Chirighin, 1987; Tizzi et al., 2010; Gubbins et al., 2007; Kleiva, Maciulskis, 2000). Calves and females' respiratory rate is a fairly good criterion for assessing the animals' physical state (Sweeney et al., 2010; Makara et al., 2007; Thurman, Williams, 1986). In some dolphinariums it is considered that it is best to keep the females and their calves separately from other dolphins, separating the females before calving (Lacave, 1991). This is done to avoid other dolphins' aggression towards the calf and the female (Parsons et al., 2003; Thurman, William, 1986). Having calved females carefully observe both the surroundings and the calf and do their best to protect it from possible dangers (Hill, 2008).

The observed dolphins' respiratory rate differed considerably depending on the size of the pool. The females and their calves' born in the bigger pool had a slower respiratory rate during the 24-hour and the entire proximity of observation compared to the females and their calves born in the smaller pool.

During the first week of observation the calves' born in the bigger pool respiratory rate sample variance twice as slow as the one in the smaller pool (0.28 and 0.53 respectively). It is possible to assume that in the bigger pool the calves needed less effort as well as energy to move, avoid possible barriers, etc.

The extremes of respiratory rate between 1.1–4.6 t/min in the bigger pool and 1.2–6.2 in the smaller one should be considered as physiological. The respiratory rate ranging between 1.2–4.6 t/min is characteristic of both the pools. The average of respiratory rate of calves kept in both the pools is within the same range – 2.4 ± 0.5 and 2.9 ± 0.7 . Thus, it is possible to expect that the conditions in both the bigger and the smaller pool will satisfy the needs of an "average" dolphin calf. The advantages of keeping females in the pool together with other dolphins before calving and after it were noticed. All females' behaviour and care after their calves was individual but in the bigger pool they felt safer. No signs of aggression from other

dolphins towards the females and their calves were noticed.

The dolphins kept in the LMM dolphinarium most frequently suffer from the viral infections of the respiratory tract. Consequently, the greatest number of dolphins dies from these diseases (Kleiva and others, 2011). There are various reasons for these diseases. Such diseases are characteristic of both the ones kept in dolphinariums and those living in the wild. It is possible that the frequency of illnesses is partly related to the anatomy structure of dolphins' respiratory system.

Morganella morganii (21.2–25.9 % cases) and *Escherichia coli* (17.3–17.9 % cases) were found in the dolphins suffering from bronchitis and bronchopneumonia. *Staphylococcus aureus* (6.1–8.6 %), *Candida albicans* (7.3–7.4 %) and *Aeromonas hydrophila* (6.2–10.6 %) were found quite frequently as well. Rather similar microorganisms and their associations were found by other authors (Ewans et al, 2006; Higgins, 2000). In 5 % or less of cases other microorganisms were found.

Enterococcus spp., *Morganella morganii*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* or *Shewanella putrefaciens* pure medium of bacteria or their combinations were secreted from the exhaled air samples taken from the sick dolphins. These bacteria were mostly isolated in spring although the dependence of separate kinds of isolated bacteria was not determined. H. A. Andreeva (2010) also argued that the dependence on the season was not determined for the changes of the composition of the micro flora from respiratory paths of the dolphins kept in the open pools in Sevastopol dolphinarium. However, the indications of the study conducted there show that the dominant bacteria in dolphins' respiratory paths are *Staphylococcus sp.* (39.5 %) are *Pseudomonas sp.* (38.5 %).

After the analysis of the season related study results had been done, it was determined that the longest proximity of dolphins' illnesses (bronchopneumonia) was in spring and the smallest number of complicated diseases were determined in the summer season. The largest number of identified pure medium of bacteria or their combinations isolated from the dolphins' respiratory paths was in spring (21.7 %). The distinct distribution of the frequency of the season related conditions of bronchitis were not determined either. The cases of illnesses of the digestive tract were determined most frequently in autumn. The largest number of undiagnosed diseases was in autumn. In five cases of undiagnosed diseases 37.5 percent of samples were found to be bacteria *Morganella morganii*, 25 % – *Escherichia coli* and *Candida albicans* and 12.5 % – *Vibrio alginolyticus* microorganisms.

When the Black sea dolphins suffer from bacterial respiratory inflammations, the determined changes of blood leucocytes formation are

similar to land animals. First of all, the increase in overall numbers of leucocytes, segmented and band neutrophils as well as monocytes is observed. However, the twofold or threefold increase above the norm is rare. In the blood from dolphins suffering from bronchitis or bronchopneumonia the average numbers of leucocytes were between 40.7–78.4 % larger (the median of segmented neutrophils was between 5.5–18.5 %, band neutrophils was between 0.8–3.5 % and the one of monocytes between 1.4–1.5 % larger).

The number of lymphocytes and eosinophils decreased. The average of leucocytes found in the blood from the examined dolphins was between 5.2–10.8 % lower than in healthy dolphins, and the average of eosinophils was between 2.6–14.2 % lower. These blood changes are not absolutes. The dynamics of leucocytes greatly depends on the pathogen, the nature of the disease, the medications administered etc. When corticosteroids are used in treatment, the increase in the number of segmented neutrophils is possible (Bossat et al, 2001b). When the dolphin is recovering, for example, after the infection of respiratory paths, the decrease in the number of segmented leucocytes is observed alongside with the decrease of the numbers of eosinophils and lymphocytes, the overall number of leucocytes is normalizing, which is considered to be a good prognostic parameter of the dolphin's health. The 10 % increase in the number of monocytes alongside with inconsiderable changes of other leucocytes groups may be evaluated as the indicator of a chronic disease.

The determined erythrocyte sedimentation rate for dolphins suffering from bronchitis, gastroenteritis, hepatitis was above the value of 2.51mm/h. The obtained result of erythrocyte sedimentation rate is the indicator of inflammation in the organism as well as the prognostic parameter of animals' health. If the inflammation is present, the red blood cells usually sediment faster. Increased erythrocyte sedimentation rate results in decreased amounts of iron in the blood. This change was seen in both dolphins suffering from bronchopneumonia and gastroenteritis: their blood contained approximately 24.6–32.3 % less iron than the blood of healthy dolphins. Decreased amounts of iron in the blood along with other blood parameters may suggest a bacterial infection, the mammals' health may be returning to normal if a rising iron levels are recorded. However such changes in the blood cannot exactly diagnose the illness. Entirely different changes in leucocyte blood profiles are possible, especially if the illness is very complicated, the organisms response may not be characteristic and it may be completely exhausted by one or a few agents of the illness (Bossart et al, 2001).

Blood tests performed on dolphins suffering from bronchitis,

bronchopneumonia or hepatitis were found to have LDH 15.0–48.6 %, AST 15.2–88.4 %, while γ GT – 1.94–5.92 was above the normal range.

Blood tests which measure the levels of alanine amino transferase, aspartate amino transferase and gamma glutamyl transferase help to observe the dolphins liver function as damaged hepatocytes release increased levels of these chemicals into the blood.

During the time of the study (1996–2010) inflammation of the respiratory system was the most common cause of death for the dolphins. Earlier A. G. Greenwood and D. C. Taylor (1997) showed through dolphin autopsies and anatomical tests that 61 % of dolphins had damaged respiratory system organs. Investigations show that most commonly, within the first two months of captivity dolphins die due to inflammation of the lungs (Bonar et al., 2007). The mammals lungs, stomach, submaxillary lymph nodes and intestinal matter may be found to contain the bacteria *Actinobacillus delphinicola* (Foster et al., 1996). Caseous necrosis of the lungs and lymph nodes may cause *Coccidioides immitis* dimorphic fungi (Dunn et al, 1982). In the cases of inflammation with purulent discharge, a *Staphylococcus delphini* bacterium is usually the causative agent. *Staphylococcus aureus* which is believed to be part of the natural micro flora of the upper respiratory tract may cause lung inflammation, septicemia, embolic nephritis and encephalitis in captive dolphins (Higgins, 2000).

In the Lithuanian Maritime museum, 25 % of deceased dolphins are diagnosed with inflammation of the stomach and small intestine. The stomachs of Atlantic bottlenosed dolphins may contain *Braunina cordiformis* and *Pholeter gastrophilus* trematoda parasites which can cause chronic granulomatous inflammation of the stomach (Jaber et al., 2006). Histological tests of the location of trematoda can diagnose parasitic granuloma (Moller, 2001). At the time of our investigation such changes were discovered in the stomach of a 12 year old male.

Dolphins may experience traumas (Parsons, Jefferson, 2000). Judging by the nature of the damage to the lower jaw of the dolphin it may be suggested that in the Lithuanian sea museum and dolphinarium another dolphin caused the injury. This resulted in inflammation with purulent discharge that can lead to septicemia.

The reasons behind the deaths of newborn dolphins are still unknown. The deaths of offspring may have been caused by an extended birth. Premature birth may have been caused by the loss of the fetus due to unknown reasons. The reasons behind newborn deaths are usually left undiscovered (Van Elk et al, 2007).

GENERAL CONCLUSIONS

1. The dynamics of haematopoiesis of healthy Black sea dolphins (*Tursiops truncatus ponticus*) males and females kept in the LMM dolphinarium was quite similar. The number of leucocytes in the blood from 2–5 year old males and females did not differ although compared to the parameters in the blood from younger and older animals it was between 10.9 % ($P<0.05$) and 20.1 % ($P<0.01$) smaller.

2. The number of erythrocytes in the blood from 2–5 year-old animals was the same for both the sexes but in the age group over 5 the number of erythrocytes in males' blood was 5.6 % ($P<0.05$) bigger than in females'. The amount of hemoglobin in the blood from the males over 5 was on average 7.2 % ($P<0.01$) bigger compared to this parameter in younger males' blood and 8.4 % ($P<0.01$) bigger than in the blood from females of the same age. The amount of hematocrit in the blood from both 2–5 and over 5 year-old males was considerably bigger than in the blood from females of the same age ($P<0.05$) and ($P<0.01$) respectively.

3. The amount of eosinophiles in the blood from females over 5 was 4.33 % bigger than in the blood from the males of the same age ($P<0.01$).

4. The amount of iron was decreasing with age. In the blood from 2–5 year-old females the amount of iron was 9.19 % bigger compared to the males of the same age ($P<0.01$).

5. The frequency of females and calves' respiratory rate considerably differed with regard to the size of the pool. During the round-the-clock and the entire period of observation the frequency of respiratory rate of the females and their calves' born in the bigger pool was 15.4 % ($P<0.01$) and 21.7 % ($P<0.01$) slower respectively than the one of the females and their calves' calved in the smaller pool. In the bigger pool where the angles of turning are smaller the females and their calves found it easier to move and as a result their respiratory rate was rarer.

6. The calves' respiratory rate during the first month after birth was closely related to their mothers' respiratory rate. It is obvious from the parameters of the correlation coefficient (in the bigger pool $r = 0.72$ – 0.74 , in the smaller one $r = 0.59$ – 0.76) that calves and their mothers' respiratory rates are often related, for most of the time they are synchronic. This relation is strong in both the bigger and the smaller pool. Due to this, the synchronicity of calves and their mothers' breath rates is more dependent on the dolphins' individual characteristics rather than the size of pools.

7. The dolphins kept in the LMM dolphinarium most frequently were ill with bacterial respiratory diseases such as bronchitis and bronchopneumonia (89.2 %). The cases of bronchitis were diagnosed more often compared to the cases of bronchopneumonia and their frequency was not related to season. However, the season had influence on more severe cases of bronchopneumonia that were most often diagnosed in spring. The most favorable water temperature with regard to the illnesses of respiratory organs was 20–21 °C. The cases of gastroenteritis were most often recorded in autumn (55.6 %).

8. A variety of Gram negative bacteria such as pathogenic *Escherichia coli*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio spp.*, *Aeromonas hydrophila*, Gram positive *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp.*, pathogenic *Candida albicans* yeast were isolated from the sick dolphins' respiratory paths.

9. The number of leucocytes in dolphins ill with bronchopneumonia and bronchitis compared to the number in healthy dolphins was between 40.7–78.4 % ($P<0.01$) larger, the number of segmented neutrophils was larger between 5.5–18.5 % ($P<0.01$), the number of band neutrophils was larger between 0.8–3.5 % ($P<0.05$ and $P<0.01$), the number of monocytes was larger between 1.4–1.5 % ($P<0.01$), the amount of bilirubin increased between 39.7–48.6 % ($P<0.05$), the level of alaninaminotransferase increased from 27.9 percent to 2.72 times ($P<0.01$), the level of aspartaminotransferase increased between 15.2–88.4 % ($P<0.01$); (only in case of bronchopneumonia) on average the amount of hemoglobin decreased between 5.4–41.6 % ($P<0.05$), the number of lymphocytes fell between 5.2–10.8 % ($P<0.01$ – 0.05).

10. The amount of potassium in the blood from dolphins that were ill with gastroenteritis compared to the one in health dolphins was 6.6 % ($P<0.005$) bigger, of glucose 6.4–27.3 % ($P<0.05$) whereas the level of gama glutamyl transferase on average decreased by 29.6 % ($P<0.01$), the level of sodium fell by 2.7 % ($P<0.01$), iron 32.3 % ($P<0.05$), urea 14.6 % ($P<0.01$).

11. In the blood of the animals that were ill with hepatitis the count of segmented neutrophils was up to 18.5 % ($P<0.01$) higher, of ferment γ GT – increased up to 5.92 times ($p<0,01$), the level of aspartaminotransferase increased up to 88.4 % ($P<0.01$); the number of erythrocytes decreased by 43.1 % ($P<0.01$) and hemoglobin fell by almost 41.6 % ($P<0.01$).

12. The decrease between 27.9–47.6 % ($P<0.01$ and $P<0.05$) in alkaline phosphatase was found in the sick dolphins' blood regardless of the diagnosed disease, and the number of eosinophils decreased by 2.6–14.2 %. The erythrocyte sedimentation rate increased between 2.2–12.1 times ($P<0.01$) and the amount of fibrinogen (except the cases when hepatitis was diagnosed) increased between 52.0 % and 1.4 times ($P<0.01$)

13. The majority of dolphins died because of the inflammation of respiratory organs (62.5 %). The rarer causes of deaths were stomach and intestine inflammation (25 %) and injuries (12.5 %). The calves were rather frequently calved dead (18.2 %).

LIST OF PUBLICATION

1. Kleiva Ž., Mačiulskis P. Development of captive – born bottlenose dolphins *Tursiops truncatus ponticus*. Veterinarija ir zootechnika. ISSN 1392-2130. 2000. 11 (3). P. 29–32.

2. Kleiva Ž., Mačiulskis P., Počekvičius A., Aniulienė A., Jonaitis E. Analysis of death causes of the captive black sea dolphins. Veterinarija ir zootechnika. ISSN 1392-2130. 2011. Vol. 53 (75). P. 9–13.

3. Kleiva Ž., Urbšys A., Aniulienė A., Žymantienė J., Mačiulskis P., Počekvičius A. Investigation of blood parameters of the Black sea dolphins (*Tursiops truncatus ponticus*) kept at the Lithuanian sea museum. Veterinarija ir zootechnika. ISSN 1392-2130. (in press).

REZIUOME

Mokslinėje literatūroje yra nemažai duomenų apie laisvėje gyvenančių suaugusių, sveikų delfinų kraujotakos rodiklių kitimus (Hyne ir kt., 1982; Hall ir kt., 2007; Terasawa ir kt., 2002), tačiau apie Juodosios jūros delfinų, laikomų delfinariumuose, hematologinių rodiklių normas, jų augimo, vystymosi, brendimo laikotarpiu duomenų nerasta.

Delfinų patelės jauniklius veda kas trejus ar ketverius metus. Jauniklių išgyvenimui labai svarbios pirmosios dienos po atvedimo. Laisvėje gyvenančių delfinų jauniklių gausumas aukštas pirmaisiais gyvenimo metais ir siekia beveik 30 procentų (Mann ir kt., 2000). Norint padidinti jauniklių išgyvenimą delfinariumuose, stengiamasi sudaryti kuo palankesnes laikymo sąlygas patelėms prieš atvedimą ir jų atvestiems jaunikliams (Jacobsen ir kt., 2003).

Norint tiksliau įvertinti jauniklių ir patelių sveikatos būklę, svarbus gyvūnų elgesio stebėjimas (Russell ir kt., 1997; Reid ir kt., 1995). Jauniklių ir patelių kvėpavimo dažnis yra gana objektyvus gyvūnų fiziologinės būklės vertinimo kriterijus (Sweeney ir kt., 2010; Makara ir kt., 2007; Thurman, Williams, 1986). Kai kuriuose delfinariumuose manoma, kad geriausiai patelės ir jauniklius laikyti atskirai nuo kitų delfinų, atskiriant jas prieš atvedimą (Lacave, 1991). Tai daroma norint išvengti kitų delfinų agresijos jauniklio ir patelės atžvilgiu (Parsons ir kt., 2003), palengvinti patelai jauniklio priežiūrą. Juos turi akylai prižiūrėti patelės, nes jaunikliai gali atsitrekti į baseino sienas, atitvarus, gali susižaloti ar būti sužaloti. Patelų poilsio arba mažesnio aktyvumo tarpai reti ir trumpi (Morisaka ir kt., 2010; Ridgway, 1986). Atrodo, kad patelėms su jaunikliais judėti didesniame baseine turi būti lengviau. Todėl iškyla klausimas – kur ir kaip geriau paruošti patelės atvedimui ir prižiūrėti jauniklius postnataliniu laikotarpiu.

Delfinai yra jautrūs įvairiems aplinkos veiksniams, todėl neišvengiamai ir gyvenantys laisvėje, ir laikomi delfinariumuose serga įvairiomis ligomis. Iširta, kad laikant gyvūnus delfinariumuose, jie gali sirgti laringitais, pneumonijomis, sinusitais ir kitomis kvėpavimo sistemos ligomis. Tačiau ligų simptomai pastebimi tik pasikeitus gyvūno elgesiui, pakitus kvėpavimo judesiams, sumažėjus apetitui (Venn-Watson ir kt., 2012). Pastebėjus ankstyvuosius ligų požymius ar tikslinant ligos diagnozę, kraujotakos tyrimai yra vieni informatyviausių ir objektyviausių rodiklių, vertinant delfinų sveikatos būklę.

Nustatyta, kad gyvūnams plaučių uždegimą sukelia morbilivirusai (Krafft ir kt., 1995), *Nocardia* bakterijos (Leger ir kt., 2009), *Cryptococcus neoformans* mikroskopiniai grybai (Miller ir kt., 2002). Kandidozė dažnai susijusi su gydymu antibiotikais ir kortikosteroidais bei vandens tarša.

Staphylococcus aureus delfinams gali sukelti plaučių uždegimą, septicemiją, embolinį nefritą ir encefalitą (Higgins, 2000). Delfinų jaunikliai, negavę motinos pieno, yra jautrūs bakterinei infekcijai ir gaišta dėl sepsio (Van Elk ir kt., 2007). Mokslinėje literatūroje delfinų gaišimo priežastys mažai aprašytos. Ši aplinkybė paskatino atlikti Lietuvos jūrų muziejaus delfinų gaišimo priežasčių analizę.

Temos aktualumas

Delfinai yra jautrūs aplinkos sąlygoms gyvūnai. Norint išlaikyti delfinus, reikia sudaryti kuo geresnes laikymo sąlygas delfinariume, laiku nutatyti susirgimus, išsiaiškinti gaišimo priežastis. Tam reikia nustatyti individualius delfinų kraujo morfologinius ir biocheminius rodiklius bei jų kitimus susirgimų atvejais. Literatūroje daugiausia randami Atlanto (*Tursiops truncatus*) ir kitų rūšių delfinų įvairūs kraujo tyrimų duomenys. Tačiau nerasta duomenų apie skirtingų lyčių ir skirtingo amžiaus Juodosios jūros delfinų (*Tursiops truncatus ponticus*) kraujo rodiklius.

Darbo tikslas ir uždaviniai

Darbo tikslas – nustatyti delfinariume laikomų Juodosios jūros delfinų (*Tursiops truncatus ponticus*) įvairių veiksnių įtaką kraujo rodikliams ir kvėpavimo funkcijai bei atlikti susirgimų ir gaišimų priežasčių analizę.

Darbo uždaviniai:

1. Nustatyti delfinariume laikomų sveikų delfinų kraujo fiziologinius morfologinius ir biocheminius parametrus, atsižvelgiant į amžių ir lytį.
2. Nustatyti baseinų dydžių (mažesnis – didesnis) įtaką delfinų patelių ir jų jauniklių kvėpavimo dažniui ir elgsenai postnataliniu periodu.
3. Išanalizuoti delfinų susirgimus ir jų dažnumą.
4. Nustatyti delfinų kraujo morfologinių ir biocheminių parametru kitimą, atsižvelgiant į susirgimus.
5. Atlikti delfinų patologinius-anatominčius, histopatologinius bei mikrobiologinius tyrimus, nustatyti gaišimo priežastis.

Mokslinis darbo naujumas ir praktinė reikšmė

Šis darbas praplėtė mokslines žinias apie delfinariume laikomų Juodosios jūros delfinų (*Tursiops truncatus ponticus*) fiziologines savybes ir patologines būkles. Nustatyta, kad skirtingas baseinų dydis lemia Juodosios jūros delfinų patelių ir jauniklių kvėpavimo dažnį bei elgseną. Žinant, kad yra genetinių skirtumų tarp kitų *Tursiops truncatus* delfinų, šiame darbe nustatyti sveikų Juodosios jūros afalinų kraujo fiziologiniai morfologiniai ir biocheminiai parametrai, atsižvelgiant į amžių ir lytį. Pirmą kartą Lietuvoje

išanalizuotas delfinų susirgimų dažnis, jų priežastys, įvertinti gyvūnų hemotologiniai, nugaišusių – patomorfoliginiai pokyčiai.

TYRIMŲ MEDŽIAGOS IR METODAI

Tyrimai Lietuvos jūrų muziejaus delfinariume, Lietuvos Veterinarijos akademijos (nuo 2010 m. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto) Patologijos centre buvo atliekami 1996–2010 metais. Ištirtas 21 Juodosios jūros delfinas (*Tursiops truncatus ponticus*). Tyrimai buvo atlikti trimis etapais (pav. 1).

Sveikų delfinų kraujo fiziologinių rodiklių nustatymas, atsižvelgiant į jų amžių ir lytį

Tyrimai Lietuvos jūrų muziejaus delfinariume buvo atliekami 8-rius metus – 2003–2010 metais, nuolat stebint delfinų adaptaciją, augimo kreivę, vystymąsi. Pagal sveikatos stebėsenos programą periodiškai buvo imami kraujo mėginiai morfologiniams ir biocheminiams rodikliams įvertinti. Tyrimams naudoti tik kliniškai sveikų 8 delfinų kraujo mėginiai. Tų pačių delfinų kraujo mėginiai, jiems augant, buvo priskiriami dviems ar trimis amžiaus grupėms. Prieš kraujo ėmimą gyvūnai buvo nešeriami 12–14 valandų. Kraujas buvo imamas rytais 8:30–10:30 val., pagal jų augimo tarpsnius visais sezonų laikotarpiais. Pagal gyvūnų amžių patinų kraujo mėginiai buvo priskirti dviems, o patelių – trims amžiaus grupėms. Sveikiems iki dviejų metų amžiaus patinams kraujas nebuvo imtas. Todėl delfinai pagal lytį ir amžių buvo suskirstyti į penkias grupes. Pirmoji grupė buvo 2–5 metų patinai (n=45 kraujo mėginiai); antroji grupė buvo vyresni nei 5 metai patinai (n=34 kraujo mėginiai); trečioji grupė buvo iki 2 metų amžiaus patelės (n=13 kraujo mėginių); ketvirtoji grupė buvo 2–5 metų amžiaus delfinų patelės (n=29 kraujo mėginiai) ir penktoji grupė buvo vyresnės nei 5 metų patelės (n=83 kraujo mėginiai). Delfinų kraujo morfologiniai rodikliai buvo tiriama analizatoriais Cell-Dyn 1700 (Abbott, JAV, 2005.) bei Cell-Dyn Ruby (Abbott, JAV, 2007). Kraujo tepinėliai dažyti Gimzoz dažais (Merck, Vokietija) ir vertinti mikroskopu (Nikon instruments, Japonija), padidinančiu 50 kartų. Delfinų kraujo biocheminiai rodikliai tirti biocheminiais analizatoriais RX DaytonaTM (Randox, Jungtinė Karalystė, 2006) ir Vitros 250 (Ortho Clinical Diagnostic, Janson & Janson, JAV, 2002). Kalio, natrio ir chloro kiekis kraujyje tirtas Ilyte analizatoriumi (Instrumentation laboratory SpA JAV, Italija, 1994), fibrinogeno kiekis nustatytas STA compact analizatoriumi Stago (Prancūzija, 2004). Eritrocitų nusėdimo greitis (ENG) tirtas Lietuvos jūrų muziejaus delfinariumo laboratorijoje. Delfinų kraujas imtas į „Terumo“ firmos „Venoject“ 2,4 ml talpos vakuuminius mėgintuvėlius su natrio citratu

ir taikyta Westergreno tyrimo metodika.

Skirtingų baseinų dydžių įtakos nustatymas, delfinų patelių ir jų jauniklių kvėpavimo dažniui ir elgsenai postnataliniu periodu

LJM delfinariume buvo stebimos šešios delfinų patelės su savo jaunikliai vieną mėnesį po gimimo. Skačiuoti patelių ir jauniklių kvėpavimo dažniai vieną kartą kiekvienos valandos pradžioje. Kvėpavimas skaičiuotas dešimties minučių laikotarpiu, pradedant delfinų įkvėpimu. Kvėpavimo dažnis, kaip rezultatas, fiksuotas išvedant kvėpavimų skaičiaus vidurkį per vieną minutę, t.y. k/min. Trys tos pačios patelės – Nr. 7, Nr. 8, Nr. 5 – atsivedė jauniklius – Nr. 7–1, Nr. 8–1, Nr. 5–1 – mažesniame, specialiai paruoštame baseine, atskirtos nuo kitų delfinų. Ir tos pačios patelės atsivedė jauniklius – Nr. 7–2, Nr. 8–2, Nr. 5–2 – būdamos didesniame baseine kartu su kitais delfinais, kurių grupę sudarė įvairaus amžiaus ir lyties gyvūnai. Gyvūnų stebėjimai mažesniame ir didesniame baseine buvo atliekami pirmąsias trisdešimt parų po jauniklių atvedimo 24 val. per parą.

Delfinų susirgimų ir jų dažnumo nustatymas

Nustatant delfinų susirgimų formas ir jų dažnumą, tyrimui buvo naudojami 9 delfinų klinikiniai, laboratoriniai duomenys nuo 1996 iki 2010 metų. Buvo fiksuojamos ligų pradžios, sirgimo laikas mėnesio dienomis. Nustatyta ligų diagnozė. Į tyrimą įtraukti ir tie atvejai, kai diagnozė nebuvo nustatyta dėl neišreikštų klinikinių požymių vienai ar kiti ligai, neinformatyvių laboratorinių tyrimų rezultatų ir panašiai, bet delfinams pasireiškė apatija, elgesio sutrikimai. Fiksuotas delfinų susirgimų metų laikas, delfinariumo baseinų vandens temperatūra ir aplinkos oro temperatūra.

Tirti mikroorganizmai iš delfinų iškvėpto oro. Nustatytas mikroorganizmų išskyrimo dažnumas priklausomai nuo metų laiko ir nuo ligų diagnozės. Iškvėpto oro mėginiai buvo imami taikant delfinų treniravimą veterinarinėms procedūroms. Delfinai pagal trenerio prašymą priplaukdavo prie baseino krašto. Vėliau buvo duodama komanda du kartus stipriai išpūsti orą. Po to buvo atliekama odos aseptika aplink kvėpuojamąją angą „Bode sterilium“[®] (Bode chemie Hamburg, Vokietija) preparatu. Po to vėl pagal komandą delfinai stipriai išpūsdavo orą ant apverstų Petri lėkštelių su diferencinėmis diagnostinėmis selektyvinėmis terpėmis.

Delfinų kraujo morfologinių ir biocheminių rodiklių kitimų nustatymas, atsižvelgiant į susirgimus

Tyrimai Lietuvos jūrų muziejaus delfinariume buvo atliekami 2003–2010 metais. Tyrimams naudoti sirgusių su stebimais klinikiniais ligų simptomais 8 delfinų kraujo mėginiai. Tyrimui panaudota trijų patinų ir

penkių patelių kraujo mėginiai. Prieš kraujo ėmimą gyvūnai buvo nešerti apie 12 valandų. Kraujas buvo imtas ryte nuo 8:30 iki 10:30 valandų pirmą dieną po susirgimo. Pagal klinikinius ligų simptomus ir gautus kraujo tyrimų rezultatus buvo nustatoma susirgimo diagnozė. Atsižvelgiant į ligos diagnozę buvo nustatinėjami kraujo rodiklių pakitimai priklausomai nuo susirgimų. Delfinų laikymo sąlygos, kraujo paėmimo, pristatymo į laboratoriją ir mėginių atlikimo technika buvo identiška, kaip ir tiriant kliniškai sveikų delfinų kraują.

Patologinis-morfologinis delfinų tyrimas

1996–2010 metais Lietuvos veterinarijos akademijos (nuo 2010 m. LSMU) Patologijos centre atlikti Lietuvos jūrų muziejaus delfinariume 8 nugaišusių ir dviejų negyvų gimusių Juodosios jūros delfinų tyrimai. Norėta išsiaiškinti jų gaišimo priežastis. Delfinų tapatumas ir amžius nustatyti pagal registracijos duomenis.

Delfinų ligos istorijos duomenys registruoti Lietuvos jūrų muziejaus pacientų registracijos žurnale. Gaišenos Lietuvos veterinarijos akademijos Patologijos centre buvo tiriamos praėjus 6–8 val. nuo gaišimo.

Patologinis-histologinis tyrimas

Histologinei analizei preparatai ruošti vadovaujantis standartine metodika. Mėginiai fiksuoti 10 proc. formalino fosfatiname buferiniame tirpale.

Patologinė medžiaga apdorota audinių įmirkymo procesoriuje (Shandon Pathcentre, USA), užlieta parafininių blokų formavimo įrenginiu (TES 99, USA).

Patologinė medžiaga pjaustyta rotaciniais mikrotomais (Leica RM2235) arba (Shandon Finesse, USA), pjūvio storis 4 µm. Pjūviai dažyti hematoksilinu ir eozinu (HE), sirijaus raudonuoju (pikrosirijum).

Mikroorganizmų išskyrimas iš tiriamųjų mėginių

Iš nugaišusių delfinų kvėpavimo angos, trachėjos, bronchų, plaučių ir ančių žarnyno tamponėliu buvo paimti mėginiai mikrobiologiniam tyrimui; iš delfinės Glorijos 8 mėn. amžiaus jauniklio lūžusio apatinio žandikaulio mikrobiologiniam tyrimui paimti pūlingo eksudato mėginiai. Mikrobiologiniai mėginiai laikyti ir transportuoti „Amies“ terpėje su anglimi (Cultiplast, Milan, Italija) 10–20 °C aplinkos temperatūroje. Bakterijos kultivuotos specialiose diferencinėse – diagnostinėse, selektyvinėse terpėse: kraujo, MacConcey, šokolado ir manitolio druskos agarų terpėse. Mikroskopiniams grybams tirti naudota Sabūro terpė (Oxoid, Anglija).

Statistinis duomenų įvertinimas

Duomenys pateikti kaip vidurkiai $\pm$ standartinė paklaida (SE), apskaičiuoti iš mažiausiai trijų nepriklausomų eksperimentų. Duomenų kitimo patikimumas įvertintas taikant neporinių eksperimentų, dviejų nuokrypių Student t-testą. Duomenys apdoroti „Microsoft Office Excel 2003“ programa. Duomenys laikomi statistiškai patikimais, kai p yra mažesnis nei 0,05 (* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$).

Statistinei analizei panaudoti Microsoft Excel lentelių analizės įrankiai. Histogramų charakteristikos (ekscesas E_x bei asimetrija A_s) apskaičiuotos, naudojant atitinkamai trečios ir ketvirtos eilės centruotus momentus. Priimta, kad ekscesas nereikšmingas, kai $E_x < 0,5$, o kai $E_x > 1,0$, laikoma, kad ekscesas yra žymus. Laikoma, kad histograma simetriška, kai $A_s \leq 0,25$. Skirstinio asimetrija laikoma žymia, kai $A_s \geq 0,5$. Ryšys tarp lyginamų variacinių eilučių laikomas stipriu, jeigu koreliacijos koeficientas $r \geq 0,5$. Skirtumai laikyti reikšmingais, jeigu, tikrinant nulinę hipotezę, Stjudento kriterijaus reikšmingumo lygis buvo $p < 0,05$. Tekste rezultatai pateikiami vidurkiais su standartiniu nuokrypiu ($M \pm SD$).

TYRIMŲ REZULTATAI

Sveikų delfinų fiziologinių hematologinių rodiklių nustatymo rezultatai, atsižvelgiant į delfinų amžių ir lytį

Lietuvos jūrų muziejaus delfinariume laikytų sveikų *Tursiops truncatus ponticus* delfinų kraujyje buvo vidutiniškai $(6,77 \pm 1,54) \times 10^9/L$ leukocitų. Nuo 2 iki 5 metų amžiaus patelių ir patinų kraujyje leukocitų kiekis nesiskyrė, tačiau buvo nuo 10,9 ($p < 0,05$) iki 20,1 ($p < 0,001$) proc. mažesnis, nei jaunesnių ar vyresnių gyvūnų kraujyje (1 lentelė).

Eritrocitų delfinų kraujyje vidutiniškai buvo $(3,91 \pm 0,49) \times 10^{12}/L$. Abiejų lyčių 2–5 metų amžiaus gyvūnų kraujyje eritrocitų kiekis nesiskyrė, tačiau vyresnių nei 5 metų patinų kraujyje eritrocitų buvo 5,6 proc. ($p < 0,05$) daugiau nei patelių. Jauniklių patelių iki 2 metų amžiaus kraujyje buvo 11,0–12,6 proc. ($p < 0,01$) daugiau eritrocitų, nei vyresnių. Visų delfinų kraujyje buvo nustatyta vidutiniškai $2,40 \pm 1,14$ proc. neviesiškai subrendusių eritrocitų, vadinamų retikulocitais. Vidutinė hemoglobino koncentracija delfinų kraujyje buvo $161,2 \pm 12,3$ g/L. Patelių kraujyje hemoglobino koncentracija nepriklausė nuo amžiaus. Patinų, vyresnių nei penkeri metai, hemoglobino kiekis buvo vidutiniškai 12,4 g/L (7,2 proc., $p < 0,01$) didesnis, nei jaunesnių patinų, o taip pat 14,6 g/L (8,4 proc., $p < 0,01$) nei bendraamžių patelių.

Vidutinis eritrocitų nusėdimo greitis LJM delfinariume laikomų delfinų kraujyje buvo $2,0 \pm 0,5$ mm/val. ir nepriklausė nei nuo gyvūnų lyties, nei nuo amžiaus.

Kadangi leukocitų kiekio, hemoglobino koncentracijos ir hematokrito vertės rodiklių variacinės eilutės buvo pasiskirstę pagal normalųjį skirstinį, tai galima daryti prielaidą, kad jų vidutinės reikšmės bei skirtumai tarp gyvūnų lyčių ir amžiaus grupių būdingi visai *Tursiops truncatus ponticus* delfinų populiacijai. Kitų tirtų kraujo rodiklių vidurkiai apibūdino tik LJM delfinariume laikomos delfinų grupės individų ypatumus.

Analizuojant delfinų kraujo leukocitinę formulę, nustatyta, kad *Tursiops truncatus ponticus* kraujyje segmentuoti neutrofilai sudarė vidutiniškai $52,1 \pm 8,5$ proc. visų leukocitų. Jaunesnių nei penkerių metų patelių kraujyje, segmentuotų neutrofilų buvo vidutiniškai 11,1–12,0 proc. ($p < 0,01$) mažiau nei vyresnių. Tarp skirtingų amžiaus grupių patinų šis skirtumas sudarė 4,0 proc. ($p < 0,05$). Vyresnių kaip penkerių metų patinų kraujyje buvo nustatyta 1,3 proc. ($p < 0,01$) daugiau lazdelinių neutrofilų. To paties amžiaus grupės patelių kraujyje nustatyta 5,0–6,3 proc. ($p < 0,01$) daugiau eozinofilų, nei jaunesnio amžiaus grupėse iki 2 metų.

Tursiops truncatus ponticus delfinų kraujyje buvo vidutiniškai $20,9 \pm 10,0$ proc. limfocitų (skaičiuojant nuo bendro leukocitų skaičiaus). Jaunesnių nei penkerių metų patelių kraujyje limfocitų buvo 18,4–19,9 proc. ($p < 0,01$) daugiau nei vyresnių gyvūnų. Tarp skirtingo amžiaus patinų grupių šis skirtumas atitinkamai sudarė 5,5 proc. ($p < 0,01$).

Delfinų kraujo biocheminių rodiklių tyrimų rezultatai nurodyti 2 lentelėje. Vidutinis šlapalo kiekis *Tursiops truncatus ponticus* delfinų kraujyje buvo $16,74 \pm 2,62$ mmol/L. Nuo 2 iki 5 metų amžiaus ir patelių, ir patinų kraujyje šlapalo buvo nuo 10,8 ($p < 0,01$) iki 16,1 proc. ($p < 0,01$) daugiau, negu jaunesnių ar vyresnių gyvūnų. Vidutinis kreatinino kiekis LJM delfinariume laikomų delfinų kraujyje buvo $131,18 \pm 28,80$ mmol/L. Kreatinino kiekių skirtumų tarp įvairaus amžiaus patelių nenustatyta, o patinų, vyresnių kaip 5 metai, kraujyje kreatinino buvo 12,3 proc. ($p < 0,05$) daugiau nei jaunesnių gyvūnų kraujyje. Fermento aspartataminotransferazės aktyvumas beveik nesiskyrė, lyginant įvairias patelių ir patinų amžiaus grupes. Tik patelių, jaunesnių nei 2 metai, kraujyje jos aktyvumas buvo 45,95 U/L (19,9 proc., $p < 0,05$) mažesnis nei vyresnių patelių. Gama glutamiltransferazės aktyvumas patinų kraujyje priklausomai nuo amžiaus nekito, o patelių – nuolat didėjo, ir vyresnių kaip 5 metų patelių kraujyje buvo 27,5 proc. ($p < 0,01$) didesnis nei jauniklių iki 2 metų. Tačiau iš visų fermentų tiktai laktatdehidrogenazės aktyvumo duomenys buvo pasiskirstę pagal normalųjį skirstinį be žymių eksceso ir asimetrijos ($A_s = 0,18$, $E_x = 0,74$).

Jauniklių patelių iki 2 metų amžiaus kraujyje buvo nuo 17,2 ($p < 0,05$) iki 22,0 ($p < 0,01$) proc. daugiau geležies nei vyresnių patelių.

Skirtingų baseinų dydžių įtakos delfinų patelių ir jų jauniklių kvėpavimo dažniui ir elgsenai postnataliniu periodu tyrimo rezultatai

Šiuo tyrimu buvo siekta išsiaiškinti, kokiose sąlygose reikėtų laikyti pateles ir jų jauniklius, kad kuo daugiau atvestų delfinų jauniklių išgyventų. Nėra vieningos nuomonės ar geriau pateles prieš jauniklių atvedimą atskirti nuo kitų delfinų grupės ir leisti jauniklius atsivesti vienoms, po atvedimo kurį laiką (mėnesį ar ilgiau) laikant su jaunikliais atskirai nuo kitų delfinų, ar leisti vesti jauniklius baseine su kitais grupės delfinais. Norint nustatyti šių laikymo būdų galimus privalumus ir trūkumus Lietuvos jūrų muziejuje buvo atliktas šis tyrimas. Išanalizuotas tų pačių patelių atvestų jauniklių kvėpavimo dažnis, atspindintis gyvūnų judėjimo intensyvumą postnataliniu periodu skirtinguose baseinuose, tai yra, tos pačios patelės jauniklius vedė mažesniame, vėliau atvedė jauniklius ir buvo stebimos didesniame baseine.

Patelių ir jauniklių vieno mėnesio po atsivedimo laikomų didesniame baseine kvėpavimo dažnio histogramos labai gerai atitinka normalųjį skirstinį ($E_x=0,12<0,2$; $A_s=0,12<0,25$) ir atitinkamai ($E_x=0,48<0,5$; $A_s=0,38<0,5$). Todėl galima manyti, kad sąlygos, įtakojančios delfinų patelių su jaunikliais iki mėnesio amžiaus kvėpavimo dažnį, šiame baseine prilygsta įprastoms populiacijai.

Patelių ir jauniklių, vieną mėnesį po atsivedimo laikomų mažesniame baseine, kvėpavimo dažnio histogramos žymiai skyrėsi nuo normaliojo skirstinio: patelių – ($E_x=1,02>1,0$; $A_s=0,71>0,5$), jauniklių – ($E_x=1,26>1,0$; $A_s=0,38<0,5$). Kadangi delfinų grupės, laikytos didesniame ir mažesniame baseinuose buvo analogiškos, todėl tikėtina, kad sąlygos, įtakojančios delfinų patelių su jaunikliais iki mėnesio amžiaus kvėpavimo dažnį, šiame baseine skyrėsi nuo populiacijai įprastų, taigi ir nuo sąlygų didesniame baseine.

Per visą stebėjimo laikotarpį patelių kvėpavimo dažnis mažesniame baseine svyravo nuo 1,2 iki 4,8 kartų per minutę ir buvo vidutiniškai 15,4 proc. ($p<0,01$) dažnesnis negu didesniame. Patelių kvėpavimo dažnis didesniame baseine svyravo nuo 1,0 iki 3,3 kartų per minutę. Vidutiniškai patelės mažesniame baseine kvėpavo $2,4\pm0,5$ kartų per minutę, o didesniame $2,1\pm0,4$ k/min.

Jaunikliai mažesniame baseine kvėpavo nuo 1,2 iki 6,2 kartų per minutę dažniu, vidutiniškai $2,9\pm0,7$ t. y. 21,7 proc. ($p<0,01$) dažniau nei didesniame. Didesniame baseine jaunikliai kvėpavo nuo 1,1 iki 4,6 kartų per minutę ir vidutiniškai $2,4\pm0,4$ kartų per minutę.

Pagal Pirsono koreliacijos koeficiento kvadrato reikšmę delfinų kvėpavimo dažnio priklausomybė nuo stebėjimo laikotarpio geriausiai buvo aproksimuojama logaritmine funkcija. Pirmąją po atsivedimo savaitę patelių kvėpavimo dažnio vidurkis dažniausiai akivaizdžiai kinta iki beveik

nusistovėjusios reikšmės per likusias stebėjimo savaites. Iškart po jauniklių atsivedimo skirtingų patelių kvėpavimo dažnio kitimo pobūdis skiriasi (didėja, mažėja arba beveik nekinta), tačiau išlieka panašus skirtinguose baseinuose.

Jauniklių kvėpavimo dažnis pirmąjį mėnesį nuo gimimo stipriai susijęs su motinų kvėpavimo dažniu. Didesniame baseine koreliacijos koeficientas $r = 0,72-0,74$, o mažesniame – $r = 0,59-0,76$.

Nei viename (didesniame ar mažesniame) baseine nebuvo nustatyta kokia nors kvėpavimo dažnio priklausomybė nuo paros laikotarpio nei pirmąją savaitę po gimimo, nei per likusį mėnesio stebėjimo laikotarpį.

Pastebėjome, kad jaunikliams ir patelėms buvo lengviau judėti didesniame baseine su mažesniais posūkio kampais. Pirmąją savaitę po gimimo jaunikliams mažesniame baseine būdavo sunkiau pasisukti kampuose, o patelėms – juos prižiūrėti. Stebėta, kaip jauniklis mažesniame baseine nusibrozdo priekinę apatinio žandikaulio dalį į baseino sieną. Didesniame baseine tokio pažeidimo nebuvo pastebėta. Gyvūnai ilgiau užsilaikydavo vandens paviršiuje ir dažniau kvėpuodavo.

Delfinų susirgimai ir jų dažnumas

Lietuvos jūrų muziejaus delfinariume laikomiems delfinams dažniausiai buvo diagnozuojami kvėpavimo organų uždegimai: bronchitai, bronchopneumonijos. Tyrimo laikotarpiu, vertinant visų devyniolikos (esančių gyvų ir nugaišusių gyvūnų), sirgusių delfinų ligas, susirgimų bronchitu buvo diagnozuota 62,1 proc., o bronchopneumonija 27,1 proc. Bendrai kvėpavimo organų ligos sudarė 89,2 proc. visų tirtų susirgimų (pav. 1).

Išskirti mikroorganizmai iš sirgusių delfinų iškvėpto oro, priklausomai nuo sezono

Sergančių delfinų iškvėpto oro mėginiuose 2/3 (69,6 proc.) atvejų aptinkama *Enterococcus* spp., *Morganella morganii*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* arba *Shewanella putrefaciens* grynos ar asocijuotos bakterijų kultūros, patogeninės *Candida albicans* mielės. Vyraujančių bakterijų šiek tiek dažniau (21,7 proc. atvejų) aptinkama pavasarį, o rečiau – vasarą (13,3 proc. atvejų). Bronchitu delfinai sirgo beveik vienodu dažnumu visais metų laikais. Tačiau daugiausia bronchopneumonijų atvejų buvo diagnozuojama pavasarį (34,0 proc. atvejų), o mažiausiai – vasarą (18,9 proc.) (pav. 2, 3). Daugiau kaip pusė susirgimų gastroenteritu atveju buvo diagnozuoti rudenį (pav. 4).

Delfinų kraujo morfologinių ir biocheminių rodiklių kitimų, atsižvelgiant į susirgimus, tyrimų rezultatai

Eritrocitų nusėdimo greičio pakitimai

Atskirų ligų atvejais Lietuvos jūrų muziejaus delfinariume laikomų sergančių delfinų kraujyje eritrocitų nusėdimo greitis buvo nuo 2,2 iki 12,1 karto didesnis ($p<0,01$), negu sveikų delfinų kraujyje. Tačiau ir šio rodiklio dispersijų skirtumai buvo tos pačios eilės.

Eritrocitų nusėdimo greitis bronchito atveju buvo tiesiogiai susijęs su monocitų skaičiaus didėjimu kraujyje ($r=0,53$), o sergant bronchopneumonija – su eozinofilų skaičiaus mažėjimu ($r=-0,52$). Hepatito atveju eritrocitų nusėdimo greitis didėjo mažėjant retikulocitų kiekiui ($r=-0,66$).

Hemoglobino kiekio pakitimai

Lietuvos jūrų muziejaus delfinariume laikomų delfinų, sergančių bronchopneumonija arba hepatitu, kraujyje buvo vidutiniškai 5,4–41,6 proc. mažiau ($p<0,01$) hemoglobino negu sveikų delfinų.

Hematokrito pakitimai

Delfinariume laikomų delfinų, sergančių hepatitu, kraujyje hematokritas buvo vidutiniškai 43,1 proc. mažesnis ($p<0,01$) negu sveikų delfinų.

Bendro leukocitų kiekio pakitimai

Delfinariume laikomų delfinų, sergančių bronchitu arba bronchopneumonija, kraujyje buvo vidutiniškai 40,7–78,4 proc. daugiau ($p<0,01$) leukocitų negu sveikų delfinų. Gyvūnams susirgus gastroenteritu ar hepatitu leukocitų kiekis kraujyje statistiškai nesiskyrė (atitinkamai $p=0,095$ ir $p=0,107$) nuo sveikų delfinų.

Segmentuotų neutrofilų kiekio kitimai

Delfinų, sergančių bronchitu, bronchopneumonija arba hepatitu, kraujyje buvo vidutiniškai 5,5–18,5 proc. daugiau ($p<0,01$) segmentuotų neutrofilų negu sveikų delfinų. Be to, bronchito atveju tokia tendencija tikėtina visoje *Tursiops truncatus ponticus* populiacijoje ($E_x=-0,87$, $A_s=-0,18$). Gastroenterito atveju segmentuotų neutrofilų kiekis sergančių delfinų kraujyje statistiškai nesiskyrė ($p=0,058$) nuo sveikų. Bet kurios ligos atveju delfinų kraujyje, didėjant segmentuotų neutrofilų kiekiui mažėja limfocitų skaičius ($r=-0,66$ – $0,98$).

Lazdelinių neutrofilų kiekio kitimai

Delfinariume laikomų delfinų, sergančių bronchitu arba bronchopneumonija, kraujyje lazdelinių neutrofilų buvo daugiau

vidutiniškai 0,8–3,5 proc. (atitinkamai $p<0,05$ ir $p<0,01$) negu sveikų delfinų.

Eozinofilų kiekio kitimai

Delfinų, sergančių bronchitu, bronchopneumonija, gastroenteritu arba hepatitu, kraujyje buvo vidutiniškai 2,6–14,2 proc. mažiau ($p<0,01$) eozinofilų negu sveikų delfinų.

Limfocitų kiekio kitimai

Delfinų, sergančių bronchitu, bronchopneumonija arba hepatitu, kraujyje buvo vidutiniškai 5,2–10,8 proc. mažiau ($p<0,01$ – $0,05$) limfocitų negu sveikų delfinų. Tačiau gastroenterito atveju limfocitų kiekis sergančių delfinų kraujyje statistiškai nesiskyrė ($p=0,481$) nuo sveikų.

Monocitų kiekio kitimai

Delfinariume laikomų delfinų, sergančių bronchitu arba bronchopneumonija, kraujyje buvo vidutiniškai 1,4–1,5 proc. daugiau ($p<0,01$) monocitų negu sveikų delfinų. Gastroenterito ir hepatito atvejais monocitų kiekis delfinų kraujyje statistiškai nesiskyrė (atitinkamai $p=0,256$ ir $p=0,662$) nuo sveikų delfinų.

Šlapalo kiekio kitimas

Delfinų, sergančių gastroenteritu, kraujyje buvo vidutiniškai 14,6 proc. mažiau šlapalo negu sveikų delfinų. Bronchito, bronchopneumonijos ir hepatito atvejais šlapalo kiekis delfinų kraujyje statistiškai nesiskyrė ($p=0,255$ – $0,484$) nuo sveikų delfinų.

Kreatinino kiekio kitimas

Delfinų, sergančių hepatitu, kraujyje buvo vidutiniškai 36,1 proc. mažiau ($p<0,01$) kreatinino negu sveikų delfinų. Bronchito, bronchopneumonijos ir gastroenterito atvejais kreatinino kiekis delfinų kraujyje statistiškai ($p=0,323$ – $0,720$) nesiskyrė nuo sveikų delfinų.

Bilirubino kiekio kitimas

Delfinariume laikomų delfinų, sergančių bronchitu arba bronchopneumonija, kraujyje buvo vidutiniškai 39,7–48,6 proc. daugiau ($p<0,05$) bendrojo bilirubino negu sveikų delfinų. Gastroenterito atvejais bilirubino kiekis sergančių delfinų kraujyje statistiškai nesiskyrė (atitinkamai $p=0,888$ ir $p=0,066$) nuo sveikų.

Gliukozės kiekio kitimas

Delfinų, sergančių bronchitu arba gastroenteritu, kraujyje buvo vidutiniškai 6,44–27,3 proc. daugiau (atitinkamai $p<0,01$ ir $p<0,05$)

gliukozės negu sveikų delfinų, o sergančių hepatitu – 31,9 proc. mažiau ($p<0,05$). Bronchopneumonijos atveju gliukozės kiekis delfinų kraujyje statistiškai nesiskyrė ($p=0,076$) nuo sveikų delfinų.

Geležies kiekio kitimas

Lietuvos jūrų muziejaus delfinariume laikomų delfinų, sergančių bronchopneumonija arba gastroenteritu, kraujyje buvo vidutiniškai 24,6–32,3 proc. mažiau (atitinkamai $p<0,01$ ir $p<0,05$) geležies negu sveikų delfinų.

Kalio kiekio kitimas

Delfinariume laikomų delfinų, sergančių bronchopneumonija, gastroenteritu arba hepatitu, kraujyje buvo vidutiniškai 3,0–12,3 proc. daugiau ($p<0,05$; hepatito atveju $p<0,01$) kalio negu sveikų delfinų. Tikėtina, kad sergant bronchopneumonija, kalio kiekio padidėjimas būdingas visai *Tursiops truncatus ponticus* delfinų populiacijai ($E_s=0,52$, $A_s=-0,15$). Bronchito atveju kalio kiekis delfinų kraujyje statistiškai nesiskyrė nuo sveikų delfinų ($p=0,122$).

Natrio kiekio pakitimai

Delfinų, sergančių bronchopneumonija arba gastroenteritu, kraujyje buvo vidutiniškai 1,1–2,7 proc. natrio mažiau ($p<0,01$) negu sveikų delfinų. Bronchito ir hepatito atveju natrio kiekis statistiškai nesiskyrė (atitinkamai $p=0,434$ ir $p=0,230$) nuo sveikų.

Laktatdehidrogenazės kiekio pakitimai (LDH)

Lietuvos jūrų muziejaus delfinariume laikomų delfinų, sergančių bronchitu, bronchopneumonija arba hepatitu, kraujyje LDH kiekis buvo vidutiniškai 15,0–48,6 proc. didesnis ($p<0,01$), o sergančių gastroenteritu – 11,6 proc. mažesnis ($p<0,05$) negu sveikų delfinų.

Šarminės fosfatazės kiekio kitimas (ŠP)

Delfinų, sergančių bronchitu, bronchopneumonija, gastroenteritu arba hepatitu, kraujyje ALP kiekis buvo vidutiniškai 27,9–47,6 proc. mažesnis ($p<0,01$) negu sveikų delfinų. Sergant hepatitu ALP sumažėjimas buvo ne toks žymus – 27,9 proc. ($p<0,05$).

Gama glutamiltransferazės (γGT), alaninaminotransferazės (ALT), aspartataminotransferazė (AST) kiekių kitimai

Delfinų, sergančių bronchopneumonija arba hepatitu, kraujyje buvo vidutiniškai 1,94–5,92 karto daugiau ($p<0,01$) γGT negu sveikų delfinų.

Gastroenterito atveju γGT kiekis sergančių delfinų kraujyje buvo vidutiniškai 29,6 proc. mažesnis ($p<0,01$) negu sveikų delfinų kraujyje. Bronchito atveju γGT kiekis statistiškai nesiskyrė nuo sveikų ($p=0,137$).

Delfinariume laikomų delfinų, sergančių bronchitu bei bronchopneumonija, kraujyje buvo vidutiniškai nuo 27,9 proc. iki 2,72 karto daugiau ($p<0,01$) ALT negu sveikų delfinų. Gastroenterito bei hepatito atvejais ALT kiekio skirtumas, lyginant su sveikų delfinų krauju nebuvo statistiškai reikšmingas (atitinkamai $p=0,271$ ir $p=0,659$).

Delfinų, sergančių bronchitu, bronchopneumonija bei hepatitu, kraujyje buvo vidutiniškai 15,2–88,4 proc. AST daugiau ($p<0,01$), o sergančių gastroenteritu – 19,0 proc. mažiau ($p<0,05$) negu sveikų delfinų.

Fibrinogeno kiekio kitimas

Delfinų, sergančių bronchitu, bronchopneumonija arba gastroenteritu, kraujyje buvo vidutiniškai nuo 52,0 proc. iki 1,4 karto daugiau ($p<0,01$), o hepatitu – 37,7 proc. fibrinogeno mažiau ($p<0,05$) negu sveikų delfinų.

Delfinų patologinių-anatominių ir histopatologinių, mikrobiologinių bei gaisimo priežasčių tyrimų rezultatai

Tyrimų duomenų analizė parodė, kad daugiausia delfinų nugaišo nuo ūmių ir lėtinių kvėpavimo takų uždegimų – 62,5 proc. Gaišimai nuo skrandžio ir plonųjų žarnų uždegimų sudarė 25 proc. Gaišimo priežastys dėl patirtos traumos sudarė 12,5 proc. Iš visų atvestų jauniklių 18,2 proc. sudarė negyvi atvesti jaunikliai. Tarp nugaišusiųjų delfinų daugiausia buvo patinų (70 proc.). Patelės gaišo vyresnio amžiaus, o patinai jaunesnio amžiaus, iš jų – 3 jaunikliai. Tyrimo laikotarpiu vienas delfinų jauniklis atvestas negyvas, o kitas – prieš laiką nutrūkus vaikingumui. Negyvam jaunikliui diagnozuota plaučių atelektazė ir hiperemija. Apžiūrint atvestą neišnešiotą 8 mėn. jauniklį, nustatytas kraujavimas į skrandį ir plonąsias žarnas. Histologiškai nustatyti pakraujavimai kepenyse, inkstuose ir blužnyje.

6 metų patinas, vardu Tafis, sumažėjus apetitui, buvo gydomas antimikrobiniais vaistais. Nugaišo staiga. Patologiniai pokyčiai būdingi ūmiam kvėpavimo organų uždegimui. Histologiškai nustatytas ūmus pūlingas bronchų ir plaučių uždegimas. 6 metų patinas, vardu Tedis, nustačius padažnęjusį kvėpavimą, buvo gydomas antimikrobiniais vaistais. Patologiniai pokyčiai buvo būdingi lėtiniam kvėpavimo organų uždegimui. Histologiškai nustatytas bronchų ir bronchiolių uždegimas, alveolių minimali fibrozė ir limfinių ląstelių infiltracija. 21 metų patinas, vardu Romas, buvo gydomas nuo kvėpavimo organų uždegimo. Patologiniai pokyčiai būdingi lėtiniam kvėpavimo organų uždegimui. Histologiškai nustatytas bronchų ir bronchiolių uždegimas, alveolių epitelio ląstelių

prolifracija ir limfinių ląstelių infiltracija.

Apie 35 metų patelė, vardu Nana, buvo gydoma nuo kvėpavimo organų uždegimo. Patologiniai pokyčiai būdingi lėtiniam kvėpavimo organų uždegimui. Histologiškai nustatytas bronchų ir bronchiolių uždegimas, alveolių sienelės židininė distrofinė kalcinozė, alveolių fibrozė ir atelektazė, taip pat kepenų ląstelių degeneracija ir židininė nekrozė bei kepenų uždegimas, inkstų žievinio sluoksnio kanalėlių minimali degeneracija ir inkstų kūnelių atrofija.

Delfinas, vardu Orfėjas, buvo gydomas antimikrobiniais vaistais. Nugaišo staiga. Patologiniai pokyčiai būdingi skrandžio ir plonųjų žarnų uždegimui bei skrandžio liaukinės dalies granulomiam uždegimui. Histologiškai nustatyta skrandžio liaukų ir plonųjų žarnų epitelio minimali degeneracija bei uždegimas, liaukinio skrandžio granulominis uždegimas.

Delfinės Glorijos 14 mėnesių jauniklės pakitęs elgesys pastebėtas ryte. Gyvūnas buvo apatiškas, nustojo ēsti. Buvo gydomas antimikrobiniais vaistais, tačiau ligos eiga buvo labai greitai. Jokių gyvūno elgesio pakitimų dieną prieš jauniklio gaišimą nebuvo pastebėta. Tą pačią dieną gyvūnas nugaišo. Skrodimo metu rasti patologiniai pokyčiai būdingi skrandžio ir plonųjų žarnų uždegimui. Histologiškai nustatyta minimali žarnų gaurelių degeneracija, skrandžio ir plonųjų žarnų gleivinės uždegimas. Atlikus patloginės medžiagos mikrobiologinius tyrimus buvo išskirtas raudonligės sukėlėjas.

14 metų patelės, vardu Nika, iškvėptame ore rasta *Candida albicans* ir *Candida tropicalis* patogeninių mielių bei *Shewanella putrefaciens* ir *Enterococcus* bakterijų. Delfinė 48 paras buvo gydoma nuo patogeninių mielių infekcijos. Blogėjant sveikatos būklei, patelė pradėta gydyti antimikrobiniais vaistais. Atlikus patloginį anatominį tyrimą, diagnozuotas pūlingas nekrozinis ančių uždegimas. Histologiškai nekrozės apimtuose ančių audiniuose nustatyti mikroskopinių grybų hifai. Mikologiniais tyrimais ančių audiniuose rasta *Candida albicans* patogeninių mielių.

Glorijos 8 mėnesių jauniklis netikėtai tapo pasyvus ir staiga nugaišo. Apžiūrint gaišena diagnozuota apatinio žandikaulio kairės pusės šakos sąnarinės ataugos skeveldrinis lūžis, pažeisto kaulo kaulinio audinio ir aplinkinių minkštųjų audinių pūlingas uždegimas, židininis pūlingas uždegimas dešiniajame inkste ir širdies raumenyje (0,5–2 cm skersmens abscesai), cista dešiniajame inkste, padidėjusi blužnis ir kepenų degeneracija. Bakteriologiniais tyrimais rasta *Staphylococcus aureus* bakterijų.

BENDROSIOS IŠVADOS

1. LJM delfinariume laikytų sveikų Juodosios jūros afalinių (*Tursiops truncatus ponticus*) patinų ir patelių hemopoezės dinamika buvo panaši. Nuo 2 iki 5 metų amžiaus patelių ir patinų kraujyje leukocitų kiekis nesiskyrė, tačiau buvo nuo 10,9 ($p<0,05$) iki 20,1 ($p<0,01$) proc. mažesnis, lyginant su jaunesnių ar vyresnių gyvūnų krauju.

2. Abiejų lyčių 2–5 metų amžiaus gyvūnų kraujyje eritrocitų kiekis nesiskyrė, tačiau patinų, vyresnių nei 5 metų, kraujyje eritrocitų buvo 5,6 proc. ($p<0,05$) daugiau nei patelių. Patinų, vyresnių nei penkeri metai, hemoglobino kiekis buvo vidutiniškai 7,2 proc., ($p<0,01$) didesnis nei jaunesnių patinų ir 8,4 proc., ($p<0,01$) didesnis nei bendraamžių patelių. Hematokrito kiekis 2–5 metų ir vyresnių nei 5 metų patinų kraujyje buvo žymiai didesnis nei tokio pat amžiaus patelių ($p<0,05$) ir ($p<0,01$) atitinkamai.

3. Patelų, vyresnių nei 5 metų amžiaus, kraujyje eozinofilų buvo 4,33 proc. daugiau nei to paties amžiaus patinų ($p<0,01$).

4. Didėjant gyvūnų amžiui, geležies kiekis mažėjo. 2–5 metų delfinų patelių kraujyje geležies buvo 9,19 proc. daugiau, lyginant su to paties amžiaus patiniais ($p<0,01$).

5. Stebėtų delfinų patelių ir jų jauniklių kvėpavimo dažnis reikšmingai skyrėsi, atsižvelgiant į baseinų dydžius. Patelų ir jauniklių atvestų didesniame baseine, paros ir viso stebėjimo metu vidutinis kvėpavimo dažnis buvo atitinkamai retesnis 15,4 proc. ($p<0,01$) ir 21,7 proc. ($p<0,01$), nei patelių ir jauniklių atvestų mažesniame baseine. Jaunikliams ir patelėms buvo lengviau judėti didesniame baseine, kur mažesni posūkių kampai, todėl ir jų kvėpavimo dažnis buvo retesnis.

6. Jauniklių kvėpavimo dažnis pirmąjį mėnesį po atvedimo buvo stipriai susijęs su motinų kvėpavimo dažniu. Iš koreliacijos koeficientų reikšmių (didesniame baseine $r = 0,72–0,74$, mažesniajame – $r = 0,59–0,76$) matyti, kad jauniklių ir jų motinų kvėpavimo dažniai susiję, didžiąja dalimi sinchroniški. Šis ryšys yra stiprus tiek didesniame, tiek ir mažesniame baseine. Todėl jauniklių ir jų motinų kvėpavimo dažnių sinchroniškumas labiau priklauso nuo individualių delfinų savybių, negu nuo baseinų dydžio.

7. Klaipėdos delfinariume laikomi delfinai dažniausia sirgo bakterinės kilmės kvėpavimo takų ligomis – bronchitais, bronchopneumonijomis (89,2 proc.). Delfinų susirgimų bronchitais buvo nustatoma daugiau nei bronchopneumonijomis ir jų dažnumas nepriklausė nuo metų laiko. Tačiau

metų laikas turėjo įtakos sunkesniems susirgimams – bronchopneumonijoms, kurių daugiausiai buvo diagnozuojama pavasarį. Kvėpavimo organų ligų atžvilgiu delfinams palankiausia baseino vandens temperatūra buvo 20–21 °C. Delfinų susirgimai gastroenteritais dažniausiai buvo diagnozuojami rudenį (55,6 proc.).

8. Iš susirgusių delfinų kvėpavimo takų dažniausiai buvo išskiriamos įvairios Gram neigiamos lazdelės formos bakterijos: tai patogeninės *Escherichia coli*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio spp.*, *Aeromonas hydrophila*. Gramteigiami kokai – *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp.*, patogeninės *Candida albicans* mielės.

9. Delfinų, sergančių bronchopneumonija ar bronchitu, lyginant su sveikais gyvūnais, vidutiniškai didėjo bendras leukocitų skaičius nuo 40,7–78,4 proc. ($p<0,01$), segmentuotų neutrofilų skaičius nuo 5,5–18,5 proc. ($p<0,01$), lazdelinių neutrofilų skaičius nuo 0,8–3,5 proc. ($p<0,05$ ir $p<0,01$), monocitų skaičius nuo 1,4–1,5 proc. ($p<0,01$), bendrojo bilirubino kiekis 39,7–48,6 proc. ($p<0,05$), alaninaminotransferazės kiekis nuo 27,9 proc. iki 2,72 karto ($p<0,01$), aspartataminotransferazės kiekis nuo 15,2–88,4 proc. ($p<0,01$); mažėjo – hemoglobino vidutiniškai (tik bronchopneumonijos atveju) nuo 5,4–41,6 proc. ($p<0,01$), limfocitų nuo 5,2–10,8 proc. ($p<0,01$ – $0,05$).

10. Delfinų, sergančių gastroenteritu, kraujyje lyginant su sveikais gyvūnais vidutiniškai didėjo kalio 6,6 proc. ($p<0,05$), gliukozės – 6,4–27,3 proc. ($p<0,01$), o vidutiniškai mažėjo geležies – 32,3 proc. ($p<0,05$), šlapalo – 14,6 proc. ($p<0,01$), gama gliutamilttransferazės – 29,6 proc. ($p<0,01$) bei natrio – 2,7 proc. ($p<0,01$) kiekiai.

11. Hepatitu sirgusių delfinų kraujyje didėjo segmentuotų neutrofilų kiekis – vidutiniškai iki 18,5 proc. ($p<0,01$), fermentų γ GT iki 5,92 karto ($p<0,01$) ir aspartataminotransferazės iki 88,4 proc. ($p<0,01$). Mažėjo eritrocitų 43,1 proc. ($p<0,01$) bei hemoglobino kiekiai iki 41,6 proc. ($p<0,01$).

12. Sergančių delfinų, nepaisant susirgimų diagnozės, kraujyje buvo nustatytas šarminės fosfatazės mažėjimas nuo 27,9–47,6 proc. ($p<0,01$ ir $p<0,05$), eozinofilų kiekio mažėjimas nuo 2,6–14,2 proc. Didėjo eritrocitų nusėdimo greitis nuo 2,2–12,1 karto ($p<0,01$) ir fibrinogeno kiekis (išskyrus hepatito atveju) nuo 52,0 proc. iki 1,4 karto ($p<0,01$).

13. Daugiausia delfinų nugaišo nuo kvėpavimo organų uždegimo (62,5 proc.). Rečiau gaišo nuo skrandžio bei plonųjų žarnų uždegimo (25 proc.), patirtų traumų (12,5 proc.). Dažnai delfinų jaunikliai atvedami negyvi (18,2 proc.).

GYVENIMO APRAŠYMAS (CURRICULUM VITAE)

Žilvinas Kleiva gimė 1970 m. rugsėjo 15 d., Raseiniuose.

1977–1988 mokėsi Raseinių vidurinėje mokykloje. 1988 m. įstojo į Lietuvos veterinarijos akademiją, kurią 1993 m. baigė ir įgijo veterinarijos gydytojo kvalifikaciją.

1993–1996 m. dirbo Palangos miesto veterinarijos ir sanitarijos stotyje, veterinarijos gydytoju.

1996–2002 m. dirbo Lietuvos jūrų muziejuje, veterinarijos gydytoju. Nuo 2002 m. iki dabar dirba vyr. veterinarijos gydytoju – direktorės pavaduotoju.

2006 m. įstojo į doktorantūrą Veterinarijos akademijos Užkrečiamų ligų katedroje. Paskelbė 2 mokslinius straipsnius, įrašytus į mokslinės informacijos instituto duomenų bazę (ISI sąrašą).