

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΘΗΛΗΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ
ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΜΑΣΤΙΤΙΔΑΣ
ΤΩΝ ΠΡΟΒΑΤΩΝ**

ΗΛΕΚΤΡΑ Α. ΦΡΑΓΚΟΥ

Κτηνίατρος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

που εκπονήθηκε στην Κλινική Μαιευτικής και Αναπαραγωγής
του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Καρδίτσα 2009

Στην οικογένειά μου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διατριβή αποσκοπεί στη μελέτη: (α) των διεργασιών που λαμβάνουν χώρα στο αρχικό στάδιο της μόλυνσης του μαστικού αδένου των προβατίνων, ιδιαίτερα σε σχέση με τη διείσδυση των βακτηρίων στη θηλή του μαστού, (β) του πιθανού ρόλου της υπάρχουσας στη θηλή βακτηριακής χλωρίδας, (γ) της φλεγμονώδους αντίδρασης κατά την οξεία φάση της μόλυνσης, (δ) των κυτταρικών υποπληθυσμών στη θηλή του μαστού και (ε) του ρόλου των λεμφοκυττάρων στην προστασία του μαστικού αδένου. Η διατριβή χωρίζεται σε έξι κεφάλαια και ακολουθεί η γενική συζήτηση.

Στο κεφάλαιο I, ανασκοπείται η σχετική βιβλιογραφία. Το κεφάλαιο υποδιαιρείται σε δύο ενότητες. Στην πρώτη, ανασκοπείται η βιβλιογραφία που αφορά στη μακροσκοπική ανατομική και στην ιστολογία της θηλής του μαστού των προβάτων. Στη δεύτερη, περιγράφονται οι αμυντικοί μηχανισμοί που αναπτύσσονται στη θηλή και το μαστικό αδένου.

Στο κεφάλαιο II, αξιολογήθηκε η σημασία των αλλοιώσεων της θηλής του μαστού στη διείσδυση βακτηρίων στο θηλαίο πόρο. Πραγματοποιήθηκαν δύο πειραματισμοί. Στον πρώτο, 12 προβατίνες χωρίστηκαν σε δύο ομάδες Α ή Β (n=6) και προκλήθηκαν αλλοιώσεις στο δέρμα της αριστερής θηλής (**A+**), ενώ στη δεξιά θηλή δεν έγινε καμία παρέμβαση (**A-**). Στη συνέχεια, στο δέρμα γύρω από το κάτω άκρο των δύο θηλών των ζώων της ομάδας Α έγινε επάλειψη θρεπτικού υλικού (**M+**) με *Mannheimia haemolytica* (στέλεχος από μαστό προβατίνας = "μαστικό" στέλεχος). Στο δέρμα γύρω από το κάτω άκρο των δύο θηλών των ζώων της ομάδας Β έγινε επίσης επάλειψη θρεπτικού υλικού (**M+**) με *M. haemolytica* (στέλεχος από ανώτερη αναπνευστική οδό αρνιού = "αναπνευστικό" στέλεχος). Στο δεύτερο πειραματισμό, χρησιμοποιήθηκαν οκτώ προβατίνες, προκλήθηκαν δε αλλοιώσεις (**A+**) στην αριστερή θηλή τους, ενώ στη δεξιά τους δεν έγινε καμία παρέμβαση (**A-**). Οι προβατίνες γαλουχούσαν τα αρνιά τους και δεν έγινε καμία άλλη παρέμβαση (**M-**). Στη συνέχεια, συλλέγονταν τακτικά δείγματα υλικού θηλαίου πόρου και γάλακτος για βακτηριολογική και κυτταρολογική εξέταση. Στον πρώτο πειραματισμό, τέσσερις προβατίνες εκδήλωσαν κλινική μαστίτιδα και οκτώ προβατίνες υποκλινική μαστίτιδα στον αριστερό μαστικό αδένου (**A+/M+**), ενώ μόνο μία εκδήλωσε υποκλινική μαστίτιδα στο δεξιό (**A-/M+**). Απομονώθηκε *M. haemolytica* από 75 από τα 120 (75/120) δείγματα υλικού θηλαίου πόρου και από 44/120 δείγματα μαστικού εκκρίματος του αριστερού ημιμόριου (**A+/M+**). Τα αντίστοιχα αποτελέσματα στο δεξιό ημιμόριο (**A-/M+**) ήταν 25/120 και 1/120. Η διάμεση τιμή του απαιτούμενου χρονικού διαστήματος για την απομόνωση του

βακτηρίου από τον αριστερό θηλαίο πόρο ήταν 0,5 ημέρα, ενώ από το δεξιό θηλαίο πόρο ήταν 2,5 ημέρες ($P=0,003$). Η διάμεση τιμή της χρονικής διάρκειας απομόνωσής του ήταν 7,25 ημέρες για τον αριστερό θηλαίο πόρο και 2 ημέρες για το δεξιό ($P=0,003$). Η διάμεση τιμή της χρονικής διάρκειας απομόνωσής του ήταν 4 ημέρες (διακύμανση: 1-7,5 ημέρες) για το γάλα του αριστερού μαστικού αδένου, ενώ η τιμή της χρονικής διάρκειας απομόνωσης για το γάλα του δεξιού μαστικού αδένου ήταν 1 ημέρα. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στη χρονική διάρκεια απομόνωσης μεταξύ των δύο στελεχών *M. haemolytica* που ενοφθαλμίστηκαν ($P>0,15$). Στο δεύτερο πειραματισμό, δύο προβατίνες εκδήλωσαν κλινική μαστίτιδα και μία προβατίνα υποκλινική μαστίτιδα στον αριστερό μαστικό αδένου (**A+/M-**), μία δε από αυτές πέθανε. Κανένα ζώο δεν εκδήλωσε μαστίτιδα στο δεξιό αδένου (**A-/M-**). Απομονώθηκαν βακτήρια (*Staphylococcus* spp. ή *M. haemolytica*) από 21/144 δείγματα του ημιμορίου **A+/M-** και από 2/144 δείγματα του ημιμορίου **A-/M-**.

Στο κεφάλαιο III παρουσιάζονται οι συνέπειες του ενοφθαλμισμού ενός "μαστικού" ή ενός "αναπνευστικού" στελέχους *M. haemolytica* σε μία θηλή του μαστού προβατίνων.

Αρχικά, παρατίθενται τα αποτελέσματα που πρέκυψαν από τον ενοφθαλμισμό ενός στελέχους *M. haemolytica* στον ένα θηλαίο πόρο 25 κλινικά υγιών προβατίνων. Στη συνέχεια, καταγράφηκαν οι αντιδράσεις που προέκυψαν, χρησιμοποιώντας κλινικές, υπερηχοτομογραφικές, βακτηριολογικές, κυτταρολογικές, αιματολογικές, φυσικοχημικές, παθολογοανατομικές και ανοσοϊστοχημικές μεθόδους. Κατά την κλινική και υπερηχοτομογραφική εξέταση παρατηρήθηκαν μεταβολές 8 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό, οι οποίες υποχώρησαν μετά από 1 και 3 ημέρες, αντίστοιχα, μετά τον ενοφθαλμισμό. Το βακτήριο απομονώθηκε από 142/150 δείγματα υλικού θηλαίου πόρου και 54/150 δείγματα γάλακτος. Η αντίδραση της δοκιμής California Mastitis Test (CMT) ήταν ≥ 1 (δηλαδή ενδεικτική ύπαρξης αυξημένου αριθμού λευκοκυττάρων) σε 143/150 δείγματα γάλακτος. Ο συνολικός αριθμός λευκοκυττάρων στο αίμα μειώθηκε δραματικά αμέσως μετά τον ενοφθαλμισμό, στη συνέχεια όμως αυξήθηκε ($P=0,01$ σε σχέση με το χρόνο). Τα άωρα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα αποτελούσαν περισσότερο από 3% του συνολικού αριθμού των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων στο αίμα. Αντίστοιχη στατιστική σημαντικότητα παρατηρήθηκε και για τις μεταβολές του αριθμού των άωρων ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων ($P<0,001$) και των λεμφοκυττάρων ($P=0,008$). Παρατηρήθηκε αύξηση του pH ($>7,0$) του γάλακτος των ενοφθαλμισμένων ημιμορίων ($P<0,01$ από 4 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό μέχρι και 1 ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό). Η διάμεση τιμή της περιεκτικότητας σε λίπος ήταν 4,50% στο γάλα από τα ενοφθαλμισμένα ημιμόρια και 7,00% στο γάλα από τα μη ενοφθαλμισμένα ημιμόρια ($P<0,045$). Η αντίστοιχη τιμή για τις ολικές πρωτεΐνες ήταν 5,00% στο γάλα από τα ενοφθαλμισμένα ημιμόρια και 5,65% στο γάλα από τα

μη ενοφθαλμισμένα ημιμόρια ($P < 0,03$ για τις διαφορές μέχρι και την 3η ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό). Η αντίστοιχη τιμή για τη λακτόζη ήταν 3,55% στο γάλα από τα ενοφθαλμισμένα ημιμόρια και 4,55% στο γάλα από τα μη ενοφθαλμισμένα ημιμόρια ($P < 0,03$ για τις διαφορές μέχρι και την 3η ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό). Το κύριο ιστοπαθολογικό εύρημα στη θηλή ήταν η έντονη λευκοκυτταρική διήθηση του επιθηλίου, η οποία ήταν αυξημένη στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου, καθώς και στο θηλαίο κόλπο. Παρατηρήθηκαν ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα, λεμφοκύτταρα και πλασμοκύτταρα. Παρατηρήθηκαν επίσης συναθροίσεις λεμφοκυττάρων με εικόνα χαρακτηριστική θυλακίου, με ή χωρίς ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα και βλαστική δραστηριότητα, στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου. Στα δείγματα από τις θηλές, ανιχνεύθηκαν B-λεμφοκύτταρα ($CD79^+$), T-λεμφοκύτταρα ($CD3^+$), $\gamma\delta$ -T-λεμφοκύτταρα ($\gamma\delta^+$) και παράγοντες του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας 2ης τάξης ($MHC-II^+$), εντός της περιοχής συνάθροισης λεμφοκυττάρων. Παρατηρήθηκε διαφορά στον αριθμό των T-κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων ($CD8^+$) μεταξύ της 3ης και της 5ης ημέρας μετά τον ενοφθαλμισμό ($P = 0,005$). Η στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς στην τελική τιμή των ανοσοϊστοχημικών ευρημάτων των μαστικών λεμφογαγγλίων (άθροισμα των αποτελεσμάτων των πέντε ανατομικών περιοχών κάθε λεμφογαγγλίου) μεταξύ των ενοφθαλμισμένων και των μη ενοφθαλμισμένων ημιμορίων ήταν $P = 0,005$ για τα B-λεμφοκύτταρα ($CD79^+$), $P = 0,585$ για τα T-λεμφοκύτταρα ($CD3^+$), $P = 0,099$ για τα $\gamma\delta$ -T-λεμφοκύτταρα ($\gamma\delta^+$), $P = 0,004$ για τα T-βοηθητικά λεμφοκύτταρα ($CD4^+$), $P = 0,585$ για τα T-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα ($CD8^+$), $P < 0,001$ για τα μακροφάγα ($CD68^+$) και $P = 0,063$ για τους παράγοντες μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας 2ης τάξης ($MHC-II^+$). Υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στην τελική τιμή των ανοσοϊστοχημικών ευρημάτων μεταξύ των χρονικών σημείων του πειραματισμού για τα B-λεμφοκύτταρα ($CD79^+$, $P = 0,01$), για τα T-βοηθητικά λεμφοκύτταρα ($CD4^+$, $P < 0,001$) και για τα μακροφάγα ($CD68^+$, $P < 0,001$).

Σε επόμενο πειραματισμό, χρησιμοποιήθηκαν 36 προβατίνες Καραγκούνικης φυλής, οι οποίες χωρίστηκαν στις εξής ομάδες: ομάδα Α (ζώα με κλινικά υγιείς θηλές του μαστού, οι οποίες ενοφθαλμίστηκαν στον ένα θηλαίο πόρο τους), ομάδα Β (ζώα σε μία θηλή του μαστού των οποίων προκλήθηκαν δερματικές αλλοιώσεις και, στη συνέχεια, ενοφθαλμίστηκαν στον αντίστοιχο θηλαίο πόρο τους) και ομάδα Γ (ζώα στα οποία ο ενοφθαλμισμός έγινε απευθείας σε ένα μαστικό αδένα) ($n = 12$). Κάθε ομάδα χωρίστηκε περαιτέρω σε τέσσερις υποομάδες, σε καθεμία από τις οποίες χρησιμοποιήθηκε διαφορετικό στέλεχος *M. haemolytica* για τον ενοφθαλμισμό των ζώων. Το στέλεχος DAG21T είχε απομονωθεί από το θηλαίο πόρο μίας προβατίνας ($n = 4$) και το στέλεχος DAG21R είχε απομονωθεί από την ανώτερη αναπνευστική οδό ενός αρνιού ($n = 4$). Τα στελέχη VSM08L ($n = 2$) και ES26L ($n = 2$) είχαν τεκμηριωμένη

παθογόνο δράση για το μαστικό αδένα των προβατίνων. Οι προβατίνες στην ομάδα Α εκδήλωσαν υποκλινική μαστίτιδα, ενώ αυτές στην ομάδα Β και Γ κλινική μαστίτιδα. Το βακτήριο απομονώθηκε από 38/72 δείγματα από την ομάδα Α, από 72/72 δείγματα από την ομάδα Β και από 37/72 δείγματα από την ομάδα Γ. Η αντίδραση της δοκιμής CMT ήταν ≥ 1 " σε 24/36, 36/36 και 36/36 δείγματα μαστικού εκκρίματος, αντίστοιχα. Η τιμή της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων ήταν 50, 150 και 79, για την ομάδα Α, Β και Γ αντίστοιχα (μέγιστη δυνατή τιμή: 192). Καμία από τις παραπάνω διαφορές μεταξύ των υποομάδων δεν ήταν σημαντική ($P > 0,9$).

Στο κεφάλαιο IV, παρουσιάζεται η σημασία της βακτηριακής χλωρίδας που βρίσκεται στη θηλή του μαστού της προβατίνας, για την παθογένεια της μαστίτιδας. Στον πρώτο πειραματισμό, χρησιμοποιήθηκαν 24 προβατίνες, οι οποίες χωρίστηκαν ως εξής ($n=8$): ομάδα Α (από το θηλαίο πόρο των ζώων αυτών απομονώθηκαν πηκτάση-αρνητικοί σταφυλόκοκκοι σε έντονη [+++] ανάπτυξη), ομάδα Β (από το θηλαίο πόρο των ζώων αυτών απομονώθηκαν πηκτάση-αρνητικοί σταφυλόκοκκοι σε μέτρια [+] ανάπτυξη) και ομάδα Γ (από το θηλαίο πόρο των ζώων αυτών απομονώθηκαν *Bacillus* spp.). Κάθε ομάδα χωρίστηκε περαιτέρω σε δύο υποομάδες: υποομάδα 1 ($n=4$) με ζώα στα οποία έγινε ενοφθαλμισμός *M. haemolytica* στο θηλαίο πόρο τους και υποομάδα 2 ($n=4$) με ζώα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν ζώα-μάρτυρες χωρίς βακτήρια στους θηλαίους πόρους (ομάδα Δ, $n=8$), στα οποία έγινε ενοφθαλμισμός *M. haemolytica* σε ένα θηλαίο πόρο τους. Απομονώθηκαν η εκάστοτε προϋπάρχουσα βακτηριακή χλωρίδα και *M. haemolytica* σε μικρότερη συχνότητα από τα ζώα της ομάδας Α1 παρά από τα ζώα της ομάδας Α2 ή Δ ($P < 0,02$ και $P < 0,05$, αντίστοιχα). Επιπλέον, η τιμή της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων στην υποομάδα Α1 ήταν 27 (μέγιστη δυνατή τιμή: 64), σημαντικά μικρότερη από αυτή στην ομάδα Δ που ήταν 72 (μέγιστη δυνατή τιμή: 128) ($P = 0,038$). Ανάλογα βακτηριολογικά ή παθολογοανατομικά ευρήματα δεν παρατηρήθηκαν στις ομάδες Β και Γ. Στο δεύτερο πειραματισμό, χρησιμοποιήθηκαν 18 προβατίνες, οι οποίες χωρίστηκαν ως εξής ($n=6$): ομάδα Ε και ομάδα ΣΤ (από τους θηλαίους πόρους των ζώων αυτών απομονώθηκαν πηκτάση-αρνητικοί σταφυλόκοκκοι) και ομάδα Ζ (χωρίς βακτήρια στους θηλαίους πόρους, μάρτυρες). Στις δύο θηλές του μαστού των ζώων της ομάδας Ε και στη μία θηλή του μαστού των ζώων της ομάδας Ζ προκλήθηκαν δερματικές αλλοιώσεις, ενώ στις θηλές του μαστού των ζώων της ομάδας ΣΤ δεν έγινε καμία παρέμβαση. Όλες οι προβατίνες της ομάδας Ε εκδήλωσαν κλινική μαστίτιδα 24 ώρες μετά την πρόκληση των αλλοιώσεων, χωρίς να έχει προηγηθεί ενδομαστικός ενοφθαλμισμός μικροβίων. Συνολικά, απομονώθηκαν με μεγαλύτερη συχνότητα βακτήρια χλωρίδας από τα ζώα της ομάδας Ε (71/72 δείγματα), παρά από τα ζώα της ομάδας ΣΤ (36/72 δείγματα) ή Ζ (0/72 δείγματα) ($P < 0,001$).

Επιπλέον, η τιμή της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων στην ομάδα Ε ήταν 28, σημαντικά μεγαλύτερη από αυτή στην ομάδα ΣΤ, που ήταν 3, και την Ζ, που ήταν 14 (μέγιστη δυνατή τιμή: 32) ($P<0,001$). Τέλος, στον τρίτο πειραματισμό, 8 προβατίνες χωρίς βακτήρια στους θηλαίους πόρους τους, χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, Η και Θ ($n=4$). Στα ζώα της ομάδας Η έγινε ενοφθαλμισμός σε ένα θηλαίο πόρο τους με *Staphylococcus simulans* και στα ζώα της ομάδας Θ απευθείας σε έναν μαστικό αδένά τους. Το στέλεχος του ενοφθαλμισμού (*S. simulans*), είχε απομονωθεί από το θηλαίο πόρο μίας προβατίνας της ομάδας Ε (2ος πειραματισμός). Οι προβατίνες της ομάδας Η εκδήλωσαν παροδική κλινική και στη συνέχεια υποκλινική μαστίτιδα, ενώ οι προβατίνες της ομάδας Θ εκδήλωσαν βαριά κλινική μαστίτιδα. *S. simulans* απομονώθηκε από 38/48 δείγματα από την ομάδα Η και 28/48 δείγματα από την ομάδα Θ. Επιπλέον, η τιμή της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων στην ομάδα Η ήταν 22 και στην ομάδα Θ ήταν 16 (μέγιστη δυνατή τιμή: 32).

Στο κεφάλαιο V, παρουσιάζονται τα ιστολογικά ευρήματα στη θηλή του μαστού αμνάδων. Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν 24 θηλές από 12 αμνάδες. Σε έξι θηλές από τρία ζώα, παρατηρήθηκαν συναθροίσεις λεμφοκυττάρων στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου.

Στο Κεφάλαιο VI, παρουσιάζονται οι διαφορές στις επιπτώσεις του ενοφθαλμισμού *M. haemolytica* εντός της θηλής του μαστού δύο διαφορετικών φυλών προβάτων, με σκοπό την αξιολόγηση πιθανών διαφορών στην ευαισθησία μεταξύ των δύο φυλών. Ένα στέλεχος *M. haemolytica* ενοφθαλμίστηκε στο θηλαίο πόρο προβατίνων Καραγκούνικης φυλής (ομάδα Κ, $n=8$) ή φυλής Frisarta (ομάδα Φ, $n=8$). Οι προβατίνες της ομάδας Κ δεν εκδήλωσαν κλινική μαστίτιδα, ενώ αντίθετα όλα τα ζώα της ομάδας Φ εκδήλωσαν οξεία κλινική μαστίτιδα ($P<0,001$). Το βακτήριο απομονώθηκε από 34/48 δείγματα υλικού θηλαίου πόρου και μαστικού εκκρίματος από ζώα της ομάδας Κ και από 46/46 δείγματα από ζώα της ομάδας Φ ($P<0,03$ μέχρι και 1 ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό, $P>0,2$ στη συνέχεια). Η αντίδραση της δοκιμής CMT ήταν ≥ 1 σε 17/24 δείγματα μαστικού εκκρίματος από ζώα της ομάδας Κ και σε 23/23 δείγματα από ζώα της ομάδας Φ. Το βακτήριο απομονώθηκε από 12/24 και 24/24 δείγματα ιστών, αντίστοιχα. Στην ιστοπαθολογική εξέταση, σε δείγματα θηλών από ζώα της ομάδας Κ παρατηρήθηκαν συναθροίσεις λεμφοκυττάρων στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου. Αντίθετα, ανάλογα ευρήματα δεν παρατηρήθηκαν σε δείγματα από θηλές ζώων της ομάδας Φ. Η βαρύτητα των παθολογοανατομικών ευρημάτων στην ομάδα Κ ήταν 41, ενώ στην ομάδα Φ ήταν 93 (μέγιστη δυνατή τιμή: 128).

Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από τα ευρήματα αυτής της διατριβής είναι τα παρακάτω.

(α) Τα λεμφοκύτταρα αποτελούν σημαντικό αμυντικό μηχανισμό της θηλής του μαστού των προβάτων. Οι περιοχές συνάθροισης λεμφοκυττάρων στις θηλές φαίνεται ότι αποτελούν ενεργοποιημένα λεμφοειδή θυλάκια (inducible-lymphoid-follicles). Η παρουσία πλασμοκυττάρων επιβεβαιώνει τη συμμετοχή χυμικής ανοσίας στη θηλή. Η παρατήρηση λεμφοκυττάρων και δομών που έμοιαζαν με λεμφοειδή θυλάκια στις θηλές αμνάδων ενισχύει την άποψη για τον εγγενή χαρακτήρα του αμυντικού αυτού σχηματισμού. Φαίνεται ότι υπάρχουν διαφορές μεταξύ φυλών στην ενεργοποίηση και τη λειτουργία των λεμφοειδών θυλακίων, οι οποίες καταδεικνύουν διαφορές στην ευαισθησία των ζώων μεταξύ τους.

(β) Δεν υπάρχουν διαφορές στην παθογόνο δράση μεταξύ στελεχών *M. haemolytica* που απομονώθηκαν από μαστό προβατίνων ("μαστικά" στελέχη) και στελεχών *M. haemolytica* που απομονώθηκαν από ανώτερη αναπνευστική οδό αρνιών ("αναπνευστικά" στελέχη). Σε ευνοϊκές συνθήκες, "αναπνευστικά" στελέχη του βακτηρίου μπορούν να διεισδύσουν στο μαστικό αδέν. Τέτοια στελέχη μπορούν να προκαλέσουν ποικίλου βαθμού μαστίτιδα, ανάλογα με την κατάσταση των αμυντικών μηχανισμών της θηλής. Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζουν τη θεωρία για μετάδοση του βακτηρίου από το αρνί στη μητέρα του κατά το θηλασμό.

(γ) Η βακτηριακή χλωρίδα που βρίσκεται στο θηλαίο πόρο, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της ασθένειας. Η βακτηριακή χλωρίδα στη θηλή μπορεί να παράσχει κάποιου βαθμού προστασία κατά των εισβαλλόντων μικροοργανισμών. Σε περίπτωση μείωσης της αμυντικής ικανότητας της θηλής, η βακτηριακή χλωρίδα της μπορεί να διεισδύσει στο μαστικό παρέγχυμα και να προκαλέσει κλινική μαστίτιδα.

Προτάσεις για περαιτέρω ερευνητική δραστηριότητα, ως συνέχεια των ευρημάτων της παρούσας διατριβής, είναι οι παρακάτω.

(α) Η αξιοποίηση των αμυντικών μηχανισμών της θηλής, πιθανόν με ανοσοενίσχυση, για την πρόληψη της μαστίτιδας.

(β) Η ταυτοποίηση γενετικών διαφορών μεταξύ των ζώων, οι οποίες αφορούν στους αμυντικούς μηχανισμούς της θηλής.

Δημοσιεύσεις που έχουν προκύψει από την παρούσα διατριβή

Στις παρακάτω επιστημονικές δημοσιεύσεις παρουσιάζονται τμήματα της παρούσας διατριβής:

I. I.A. Fragkou, V.S. Mavrogianni, P.J. Cripps, D.A. Gougoulis, G.C. Fthenakis (2007). "The bacterial flora in the teat duct of ewes can protect against and can cause mastitis" *Veterinary Research*, 38:525-545.

- II. I.A. Fragkou, V.S. Mavrogianni, N. Papaioannou, C.M. Boscós, P.J. Cripps, J. Skoufos, G.C. Fthenakis (2007). "Presence of sub-epithelial lymphoid nodules in the teat of ewe-lambs and adult ewes" *Small Ruminant Research*, 70:286-291.
- III. I.A. Fragkou, N. Papaioannou, P.J. Cripps, C.M. Boscós, G.C. Fthenakis (2007). "Teat lesions predispose to invasion of the ovine mammary gland by *Mannheimia haemolytica*" *Journal of comparative Pathology*, 137:239-244.
- IV. I.A. Fragkou, J. Skoufos, P.J. Cripps, I. Kyriazakis, N. Papaioannou, C.M. Boscós, A. Tzora, G.C. Fthenakis (2007). "Differences in susceptibility to *M. haemolytica*-associated mastitis between two breeds of dairy sheep" *Journal of Dairy Research*, 74:349-355.
- V. I.A. Fragkou, N. Solomakos, M.P. Dagleish, P.J. Cripps, N. Papaioannou, C.M. Boscós, H.N. Ververidis, C. Billinis, D.C. Orfanou, A. Govaris, I. Kyriazakis, G.C. Fthenakis (2008). "Effects of experimental challenge of ewes with *Mannheimia haemolytica* on subsequent milk composition" *Journal of Dairy Research*, 75:340-346.
- VI. H.A. Φράγκου, N. Παπαϊωάννου, M.P. Dagleish, P.J. Cripps, K.M. Μπόσκος, X.N. Βερβερίδης, Δ.Κ. Ορφανού, N. Σολωμάκος, J. Finlayson, A. Γκόβαρης, H. Κυριαζάκης, Γ.Χ. Φθενάκης (2009). "Ρόλος των λεμφοειδών θυλακίων στη θηλή των προβατίνων κατά την ενδομαστική μόλυνση με *Mannheimia haemolytica*" *Περιοδικό της ελληνικής κτηνιατρικής Εταιρείας*, δεκτό για δημοσίευση [Άρθρο που βραβεύτηκε με το βραβείο "Κωνσταντίνος Ταρλατζής", ως η καλύτερη ελεύθερη ανακοίνωση στο πεδίο της Αναπαραγωγής παραγωγικών ζώων, στο 11ο Πανελλήνιο Κτηνιατρικό Συνέδριο (Αθήνα, 2009)].
- VII. I.A. Fragkou, M.P. Dagleish, N. Papaioannou, P.J. Cripps, C.M. Boscós, H.N. Ververidis, D.C. Orfanou, N. Solomakos, J. Finlayson, A. Govaris, I. Kyriazakis, G.C. Fthenakis (2010) "The induction of lymphoid follicle-like structures in the ovine teat duct following experimental infection with *Mannheimia haemolytica*" *The veterinary Journal*, δεκτό για δημοσίευση.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Γ.Χ. Φθενάκης, Καθηγητής

Επιβλέπων

Κλινική Μαιευτικής και Αναπαραγωγής, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Κ. Μπόσκος, Καθηγητής

Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής

Κλινική Παραγωγικών Ζώων, Κτηνιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Ν. Παπαϊωάννου, Αναπληρωτής καθηγητής

Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής

Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, Κτηνιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Η. Κυριαζάκης, Καθηγητής

Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Κ. Μπόσκος, Καθηγητής

Κτηνιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Γ.Χ. Φθενάκης, Καθηγητής

Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Α. Γκόβαρης, Αναπληρωτής καθηγητής

Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ν. Παπαϊωάννου, Αναπληρωτής καθηγητής

Κτηνιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Γ.Σ. Αμοιρίδης, Επίκουρος καθηγητής

Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

P.J. Cripps, Senior lecturer

Faculty of Veterinary Science, University of Liverpool

UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

**PATHOGENESIS OF OVINE MASTITIS,
WITH SPECIAL REFERENCE TO
THE DEFENCE ROLE OF THE TEAT**

ILECTRA A. FRAGKOU

DVM (Thessaly)

**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY**

Work carried out at the Department of Obstetrics and Reproduction
of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Thessaly

Karditsa, Greece 2009

ABSTRACT

The objective of the present thesis was to elucidate (a) processes that take place during the initial stage of mammary infection, specifically in relation to bacterial entrance into the teat, (b) the possible role of bacteria flora in the teat, (c) the inflammatory reaction of the animal during the acute phase of the disease, (d) cellular sub-populations in the teat and (e) the possible role of lymphocytes in protecting the mammary gland.

The thesis is divided into six chapters followed by the general discussion.

In the first chapter, the relevant literature is reviewed. The chapter is subdivided into two parts. In part A, the literature on the anatomy and histology of the teat of ewes is briefly reviewed. In part B, the defences of the teat and the mammary gland are described.

In the second chapter, a study, with objective to investigate whether teat lesions in ewes would facilitate the ascent of *M. haemolytica* into the mammary gland and subsequent colonization, is described. Two experiments were carried out. In the first experiment, 12 ewes were divided into one of two equal groups (n=6); ewes in group A were challenged with *M. haemolytica* recovered from the mammary gland of a ewe and ewes in group B were challenged with *M. haemolytica* recovered from the tonsils of a lamb. In each ewe, the left teat was chapped (**CP**) and then challenged (**CH**), a treatment referred to as **CP+/CH+**; the right teat was challenged but not chapped (**CP-/CH+**). In the second experiment, eight ewes, each with two lambs were used. The procedures were as described for the first experiment I, except that the ewes continued to suckle their lambs and were not deliberately challenged. Infection of the teat skin, teat duct and mammary gland were monitored by means of conventional bacteriological techniques. In experiment I, four ewes developed clinical mastitis and the remaining eight ewes subclinical mastitis in the left (**CP+/CH+**) mammary gland, whilst only ewe developed subclinical mastitis in the right (**CP-/CH+**) gland. *M. haemolytica* was recovered from 75 of the 120 (75/120) samples of teat duct material and from 44/120 mammary secretion samples from the left (**CP+/CH+**) side. Respective results in the right (**CP-/CH+**) side were 25/120 and 1/120. Estimated time to infection for the left (**CP+/CH+**) side was 0.5 day, whilst for the right (**CP-/CH+**) side, the median time to infection was 2.5 days ($P=0.003$). The duration of infection was also different, with a median of 7.25 days for the left compared with 2.0 days for the right teat ($P=0.003$). Isolation from the milk of the left glands lasted 1.0 to 7.5 days with a median value of 4 days, whilst isolation from the only right gland lasted 1 day. The two strains of *M. haemolytica*

used (ewes of group A or group B) did not differ significantly in respect of the mean duration of isolation from the teat duct (6 and 8.5 days; $P=0.176$) or the milk (3 and 4 days; $P=0.324$). In the second experiment, two ewes developed clinical mastitis and one subclinical mastitis on the left (**CP+/CH-**) mammary gland; one ewe died five days after chapping. None of the ewes developed mastitis on the right (**CP-/CH-**) mammary gland. Bacteria (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* and *M. haemolytica*) were isolated from 7/8 left (**CP+/CH-**) teat ducts and from 1/8 right (**CP-/CH-**) teat ducts ($P=0.03$); bacteriological positive samples were 21/144 and 2/144, respectively.

In the third chapter, the reactions after experimental deposition of a mammary or respiratory *M. haemolytica* into the ovine teat duct.

A *M. haemolytica* isolate was deposited into one teat of 25 ewes and the clinical, ultrasonographic, bacteriological, cytological, haematological, physicochemical, gross-pathological, histological and immunohistochemical reactions were monitored. Clinical and ultrasonographic changes were evident by 8 h after challenge, but subsided by 2 and 4 d after challenge, respectively. The organism was consistently isolated from samples of teat duct material (142/150), but not from mammary secretion (54/150). The California Mastitis Test scores increased (>1) and remained high (143/150 samples). Polymorphonuclear neutrophils (PMN) predominated ($\geq 85\%$) in milk films up to 1 d after challenge, but the proportion of lymphocytes and macrophages progressively increased (5%-20% and 10-40%, respectively) thereafter. Total blood leukocyte counts decreased immediately after challenge, then rose ($10933 \text{ cells } \mu\text{l}^{-1}$) until 1 day after challenge ($P=0.01$ over time); immature PMNs were $>3\%$ of total after challenge. Significant change over time was also evident for immature neutrophils ($P<0.001$) and for lymphocytes ($P=0.008$). Increased pH values (>7.0) were recorded in milk from the challenged side; median values were 6.82 up to 8 h after challenge, 7.20 from 12 h after challenge up to D1 and 6.95 from D2 up to D5; respective figures for milk from control sides were 6.70, 6.72 and 6.73 ($P<0.01$ from 4h after challenge up to and including D1). Compared to pre-challenge values, fat, total protein and lactose content of milk decreased significantly after challenge. Moreover, fat, protein and lactose content of milk from inoculated sides was significantly smaller to that of the contralateral sides. The median fat content of milk from challenged sides was 4.50% and that of control sides 7.00% ($P<0.045$ throughout); median total protein content of milk from challenged sides was 5.00% and that of control sides was 5.65% ($P<0.03$ up to and including 3 d after challenge); lactose content was 3.55% and 4.55% ($P<0.03$ up to and including 3 d after challenge). Histologically, there was prominent leucocytic (PMNs, lymphocytes, plasma cells) infiltration in clusters under the epithelium of the teat.

Polymorphonuclear neutrophils were more prominent at the border between teat duct and teat cistern in ewes euthanatized 4 h after challenge and thereafter; they also extended into the teat cistern in the ewes euthanatized 1 d after challenge and thereafter. Three and 5 d after challenge, a follicle-like structure, characterized by accumulation of lymphocytes and plasma cells, with an apparent germinal centre, was observed in the lamina propria between the teat duct and the teat cistern. In teat tissue samples, CD79⁺, CD3⁺, $\gamma\delta$ -T cells⁺, CD68⁺ and MHC-II⁺ cells were present; there was an increase of CD8⁺ cells from 3 d to 5 d after challenge ($P=0.005$). Immunohistochemistry scores in supra-mammary lymph nodes of the challenged side were either similar to or higher than in the control side: for CD79⁺ $P=0.005$, for CD3⁺ $P=0.585$, for $\gamma\delta$ ⁺ $P=0.099$, for CD4⁺ $P=0.004$, for CD8⁺ $P=0.585$, for CD68⁺ $P<0.001$, and for MHC-II⁺ cells $P=0.063$. The numbers of CD79⁺, CD4⁺ and CD68⁺ cells were also significantly higher in ewes euthanatized at later days after challenge ($P=0.01$, $P=0.05$ and $P<0.001$, respectively). At each time-point, the number of CD8⁺ cells was significantly smaller than that of all other cells ($P<0.003$).

Subsequently, 36 ewes were allocated into three groups: A (with clinically healthy teats and challenged into the teat duct), B (with experimentally chapped teats and challenged into the teat duct) and C (challenged in the mammary gland) ($n=12$), and were subdivided into four subgroups. Each subgroup was challenged with one of the following *M. haemolytica* strains: strain DAG21T from the teat duct of a ewe, strain DAG21R from the tonsils of a lamb and strains VSM08L and ES26L of known pathogenicity for the ovine mammary gland. Ewes in group A developed subclinical mastitis, whilst ewes in groups B and C developed clinical mastitis. *M. haemolytica* was isolated from 38/72 samples in group A, 72/72 samples in group B and 37/72 samples in group C. The CMT was positive in 24/36, 36/36 and 36/36 mammary secretion samples, respectively. Scores for pathological findings were 50, 150 and 79, respectively (maximum possible: 192). There were no statistically significant differences between groups ($P>0.9$).

In the fourth chapter, the possible effects of bacterial populations within the teat duct, in the pathogenesis of ovine mastitis were studied. Clinical, bacteriological, cytological and pathological methods were used. In the first experiment, 32 ewes were allocated into group A ($n=8$; ewes from whose teat duct coagulase-negative staphylococci were isolated [+++ growth]), B ($n=8$; ewes from whose teat duct coagulase-negative staphylococci were isolated [+ growth]) or C ($n=8$; ewes from whose teat duct *Bacillus* spp. were isolated) and subdivided into A1, B1, C1 ($n=4$; challenged by deposition of *M. haemolytica* into the teat duct) or A2, B2, C2 ($n=4$; used as uninoculated controls); group D ($n=8$) contained ewes with no bacteria in their teat ducts and

challenged by deposition of *M. haemolytica* into the teat duct). There were less bacteriological isolations of pre-existing flora ($P<0.02$) and challenge ($P<0.05$) organisms from teat duct of A1 than of A2 or D ewes; the severity of pathological findings in A1 (summed up score: 27, maximum possible: 64) ewes was smaller than in D (summed up score: 72, maximum possible: 128) ewes ($P=0.038$). No such findings were evident with B1 or C1 ewes. In the second experiment, ewes (groups E and F, $n=6$) from whose teat duct coagulase-negative staphylococci were isolated, were used; in group G ($n=6$) ewes with no bacteria in their teat ducts, were included. Teat chapping was applied in both teats of E and in one teat of G ewes, whilst teats of F ewes were not chapped. All E ewes developed acute clinical mastitis within 24 h after teat chapping, although no bacterial challenge had been carried out; there were more bacteriological isolations of pre-existing flora organisms from E (71/72 samples) than from F (36/72 samples) or G (0/72 samples) ewes ($P<0.001$); the severity of pathological findings in E (score: 28, maximum possible: 32) was greater than in F (score: 3, maximum possible: 32) or G (score: 14, maximum possible: 32) ewes. In the third experiment, 8 ewes with no bacteria in their teat ducts were allocated into group H or I ($n=4$) and challenged into the teat duct (group H) or into the mammary gland (group I) with a *Staphylococcus simulans* isolate previously recovered from the teat duct of a group E ewe (2nd experiment above). Group H ewes developed transiently clinical followed by subclinical mastitis, whilst group I ewes developed severe clinical disease. *S. simulans* was isolated from 38/48 samples from group H ewes and from 28/48 samples from group I; the score of severity of pathological findings in group H ewes was 22 and in group I ewes 16 (maximum possible: 32).

In the fifth chapter, the histological findings in the teat of ewe-lambs are presented. Twenty-four clinically healthy teats from 12 pre-pubertal ewe-lambs were examined bacteriologically and histologically. No bacteria were isolated from any of these teats. No pathological findings were evident in any teat. The epithelial cells were characteristically under-developed. Subjacent to the teat cistern epithelium, lymphocytes were evident in six teats (25%) from three ewes, i.e. the cells were observed in both teats of the same ewes. These lymphocytes were observed as aggregates in small numbers, but with no germinal activity, at the border between teat duct and teat cistern.

In the sixth Chapter, the differences in susceptibility to *M. haemolytica*-associated mastitis, between two different breeds of dairy sheep are presented. A *M. haemolytica* isolate was deposited into the teat duct of Karagouniko (group K, $n=8$) or Frisarta (group F, $n=8$) ewes. The animals were monitored by means of clinical, bacteriological, cytological and pathological methods. K-group ewes did not develop any clinical signs, whilst F ewes became ill and

developed acute clinical mastitis by 1 d after challenge ($P < 0.001$). Bacteria were isolated from 34/48 samples from K-group ewes and from 46/46 samples from F-group ewes ($P < 0.03$ up to 1 d after challenge, $P > 0.2$ thereafter). Positive CMT results were observed in 17/24 samples from K-group ewes and in 23/23 samples from F-group ewes; leucocytes were seen in Giemsa-stained films. Total pathology score summed over all group K ewes was 41 (maximum possible: 128); *M. haemolytica* was isolated from 12/24 tissue samples. Total pathology score summed over all group F ewes was 93 (maximum possible: 128); *M. haemolytica* was isolated from 24/24 tissue samples. Follicle-like structures, characterized by accumulation of lymphocytes and plasma cells, with an apparent germinal centre were present at the border between teat duct - teat cistern of group K ewes; no such structures were observed in teats of group F ewes.

General and more specific conclusions deriving from the results of the present thesis are as follows.

(a) Lymphocytes constitute an important defence mechanism of the teat of ewes. Lymphocytes in infected teats may contribute to an organized defence of the host when macrophages and PMNs fail because of bacterial virulence. The area of lymphocytic accumulation in the teat seems to be an inducible-lymphoid-follicle-like structure, which acts as a locally organized immune defence. Presence of plasma cells indicates a possible role for humoral immunity in the teat. Presence of these structures in pre-pubertal ewe-lambs supports the view regarding their innate defensive character. There seem to be breed differences in the activation and the function of these structures, which may reflect possible differences in susceptibility to mastitis.

(b) There are no differences in the pathogenic action between "mammary" and "respiratory" strains of *M. haemolytica*. Under favourable conditions, respiratory strains can invade into the teat and the mammary gland. These strains can cause mastitis of various degree, depending on the efficiency of the teat defence mechanisms. The findings support the theory regarding transmission of this organism from the lamb to its dam during sucking.

(c) Bacterial flora present in the teat duct plays an important role in mastitis pathogenesis. Staphylococcal flora in the teat can afford some degree of protection against invading microorganisms. However, in case of impeded defence mechanisms of the teat, the same bacterial flora can invade into the mammary parenchyma and cause clinical mastitis.

Suggestions for further research continuing the results of the present thesis are as follows.

(a) Exploitation and immuno-enhancement of the teat defences for effective prevention of mastitis in ewes. (b) Study of possible genetic differences among animals, regarding the teat defences of ewes.

Publications associated with the present thesis

The following scientific papers presenting facets of the present thesis, are available:

- I. I.A. Fragkou, V.S. Mavrogianni, P.J. Cripps, D.A. Gougoulis, G.C. Fthenakis (2007). "The bacterial flora in the teat duct of ewes can protect against and can cause mastitis" *Veterinary Research*, 38:525-545.
- II. I.A. Fragkou, V.S. Mavrogianni, N. Papaioannou, C.M. Boscós, P.J. Cripps, J. Skoufos, G.C. Fthenakis (2007). "Presence of sub-epithelial lymphoid nodules in the teat of ewe-lambs and adult ewes" *Small Ruminant Research*, 70:286-291.
- III. I.A. Fragkou, N. Papaioannou, P.J. Cripps, C.M. Boscós, G.C. Fthenakis (2007). "Teat lesions predispose to invasion of the ovine mammary gland by *Mannheimia haemolytica*" *Journal of comparative Pathology*, 137:239-244.
- IV. I.A. Fragkou, J. Skoufos, P.J. Cripps, I. Kyriazakis, N. Papaioannou, C.M. Boscós, A. Tzora, G.C. Fthenakis (2007). "Differences in susceptibility to *M. haemolytica*-associated mastitis between two breeds of dairy sheep" *Journal of Dairy Research*, 74:349-355.
- V. I.A. Fragkou, N. Solomakos, M.P. Dagleish, P.J. Cripps, N. Papaioannou, C.M. Boscós, H.N. Ververidis, C. Billinis, D.C. Orfanou, A. Govaris, I. Kyriazakis, G.C. Fthenakis (2008). "Effects of experimental challenge of ewes with *Mannheimia haemolytica* on subsequent milk composition" *Journal of Dairy Research*, 75:340-346.
- VI. I.A. Fragkou, N. Papaioannou, M.P. Dagleish, P.J. Cripps, C.M. Boscós, H.N. Ververidis, D.C. Orfanou, N. Solomakos, J. Finlayson, A. Govaris, I. Kyriazakis, G.C. Fthenakis (2009). "Role of inducible-lymphoid-follicle-like structures at the teat duct of ewes during intramammary infection with *Mannheimia haemolytica*" *Journal of hellenic veterinary medical Society*, accepted for publication - Publication awarded the "Konstantinos Tarlatzis" prize, as best short communication in the field of Farm animal reproduction, during the 11th Greek veterinary Congress (Athens, 2009)].
- VII. I.A. Fragkou, M.P. Dagleish, N. Papaioannou, P.J. Cripps, C.M. Boscós, H.N. Ververidis, D.C. Orfanou, N. Solomakos, J. Finlayson, A. Govaris, I. Kyriazakis, G.C. Fthenakis (2010) "The induction of lymphoid follicle-like structures in the ovine teat duct following experimental infection with *Mannheimia haemolytica*" *The veterinary Journal*, in press.

ADVISORY COMMITTEE

Professor G.C. Fthenakis

Supervisor

Department of Obstetrics and Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly

Professor C. Boscós

Member of the advisory committee

Department of Farm Animal Clinical Studies, School of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki

Associate professor N. Papaioannou

Member of the advisory committee

Department of Pathology, School of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki

EXAMINATION BOARD

Professor C. Boscós

School of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki

Professor G.C. Fthenakis

Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly

Professor I. Kyriazakis

Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly

Associate professor A. Govaris

Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly

Associate professor N. Papaioannou

School of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki

Assistant professor G.S. Amiridis

Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly

Senior lecturer P.J. Cripps

Faculty of Veterinary Science, University of Liverpool

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ - ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ	10
ABSTRACT	12
ADVISORY COMMITTEE - EXAMINATION BOARD	18
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	20
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	24
Πρόλογος- Σκοποί της παρούσας διατριβής	25
Ευχαριστίες	26
ΚΕΦΑΛΑΙΟ I	29
ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ	
A. ΜΑΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΚΑΙ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΘΗΛΗΣ	
ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΤΩΝ ΠΡΟΒΑΤΩΝ	30
B. ΑΜΥΝΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΗ ΘΗΛΗ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	35
Εισαγωγή	35
Ο ρόλος της κερατίνης του θηλαίου πόρου	36
Κυτταρικοί αμυντικοί μηχανισμοί	37
Ο ρόλος των κυτοκινών	56
ΚΕΦΑΛΑΙΟ II	58
ΔΙΕΙΣΔΥΣΗ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ <i>MANNHEIMIA HAEMOLYTICA</i> ΣΤΗ ΘΗΛΗ	
ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΤΩΝ ΠΡΟΒΑΤΩΝ	
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	59

Β. ΔΙΕΙΣΔΥΣΗ <i>MANNHEIMIA HAEMOLYTICA</i> ΣΤΗ ΘΗΛΗ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΤΩΝ ΠΡΟΒΑΤΩΝ	60
Υλικά και μέθοδοι	60
Αποτελέσματα	67
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ	74
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΟΣ <i>MANNHEIMIA HAEMOLYTICA</i> ΣΤΗ ΜΙΑ ΘΗΛΗ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΤΩΝ ΠΡΟΒΑΤΩΝ	
Α. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	75
Β. ΣΥΝΕΠΕΙΕΣ ΤΟΥ ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΟΥ ΕΝΟΣ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ <i>MANNHEIMIA HAEMOLYTICA</i> ΣΤΗ ΘΗΛΗ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΤΩΝ ΠΡΟΒΑΤΩΝ	76
Υλικά και μέθοδοι	76
Αποτελέσματα	77
Γ. ΣΥΝΕΠΕΙΕΣ ΤΟΥ ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΟΥ ΕΝΟΣ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ <i>MANNHEIMIA HAEMOLYTICA</i> ΑΠΟ ΑΝΩΤΕΡΗ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗ ΟΔΟ ΑΡΝΙΟΥ, ΣΤΗ ΘΗΛΗ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΤΩΝ ΠΡΟΒΑΤΩΝ	105
Υλικά και μέθοδοι	105
Αποτελέσματα	107
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙV	
112	
ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗΣ ΧΛΩΡΙΔΑΣ ΣΤΟ ΘΗΛΑΙΟ ΠΟΡΟ ΤΩΝ ΠΡΟΒΑΤΩΝ	
Α. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	113
Β. ΣΥΝΕΠΕΙΕΣ ΤΟΥ ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΟΥ <i>MANNHEIMIA HAEMOLYTICA</i> ΣΤΗ ΘΗΛΗ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΠΡΟΒΑΤΩΝ, ΜΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΧΛΩΡΙΔΑ ΣΤΟ ΘΗΛΑΙΟ ΠΟΡΟ ΤΟΥΣ	116
Υλικά και μέθοδοι	116
Αποτελέσματα	119
Γ. ΣΥΝΕΠΕΙΕΣ ΤΗΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΠΡΟΚΛΗΣΗΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΩΝ ΣΤΗ ΘΗΛΗ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΠΡΟΒΑΤΩΝ ΜΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΧΛΩΡΙΔΑ ΣΤΟ ΘΗΛΑΙΟ ΠΟΡΟ ΤΟΥΣ	131
Υλικά και μέθοδοι	131
Αποτελέσματα	132

Δ. ΣΥΝΕΠΕΙΕΣ ΤΟΥ ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗΣ ΧΛΩΡΙΔΑΣ (<i>STAPHYLOCOCCUS SIMULANS</i>) ΤΟΥ ΘΗΛΑΙΟΥ ΠΟΡΟΥ ΣΤΟ ΜΑΣΤΟ ΠΡΟΒΑΤΩΝ	140
Υλικά και μέθοδοι	140
Αποτελέσματα	141
ΚΕΦΑΛΑΙΟ V	149
ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΣΕ ΘΗΛΕΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΚΛΙΝΙΚΑ ΥΓΙΩΝ ΑΜΝΑΔΩΝ	
Εισαγωγή	150
Υλικά και μέθοδοι	150
Αποτελέσματα	151
ΚΕΦΑΛΑΙΟ VI	
155	
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΟΣ <i>MANNHHEIMIA HAEMOLYTICA</i> ΣΤΗ ΘΗΛΗ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΠΡΟΒΑΤΩΝ ΔΥΟ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΦΥΛΩΝ	
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	156
B. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΔΥΟ ΦΥΛΩΝ	157
Υλικά και μέθοδοι	157
Αποτελέσματα	158
ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	164
Εισαγωγή	165
Διείσδυση του βακτηρίου <i>Mannheimia haemolytica</i> στη θηλή του μαστού των προβάτων	165
Συνέπειες του ενοφθαλμισμού ενός στελέχους <i>M. haemolytica</i> από μαστό προβάτου, στη θηλή του μαστού των προβάτων	167
Συνέπειες του ενοφθαλμισμού ενός στελέχους <i>M. haemolytica</i> από ανώτερη αναπνευστική οδό αρνιού, στη θηλή του μαστού των προβάτων	171
Σημασία της βακτηριακής χλωρίδας στο θηλαίο πόρο των προβάτων	172
Πειραματικός ενοφθαλμισμός <i>M. haemolytica</i> στη θηλή του μαστού προβάτων δύο διαφορετικών φυλών	176
Σημασία των λεμφοκυττάρων στη θηλή	177

Συμπεράσματα 180

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ 182

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Πρόλογος - Σκοποί της παρούσας διατριβής

Η μαστίτιδα είναι η πιο σημαντική ασθένεια του μαστικού αδένος (Schalm, Carroll & Jain 1971) και οι οικονομικές επιπτώσεις της στις προβατοτροφικές εκμεταλλεύσεις είναι αξιοσημείωτες. Στη χώρα μας, όπου η παραγωγή γάλακτος και γαλακτομικών προϊόντων αποτελεί την κύρια παραγωγική κατεύθυνση της προβατοτροφίας, η οικονομική σημασία της νόσου είναι ιδιαίτερα σημαντική. Έτσι, η διατήρηση της υγείας του μαστικού αδένος και η προστασία του από παθογόνους μικροοργανισμούς πρέπει να αποτελούν προτεραιότητες των κτηνιάτρων και των κτηνοτρόφων.

Η θηλή του μαστού, ως φυσικό όριο μεταξύ του εξωτερικού περιβάλλοντος και του μαστικού αδένος, είναι η πύλη εισόδου των βακτηρίων. Στις αγελαδοτροφικές εκμεταλλεύσεις, η σημασία της διατήρησης της υγείας των θηλών του μαστού έχει τεκμηριωθεί σε πληθώρα μελετών. Αντίθετα, στα μικρά μηρυκαστικά οι σχετικές μελέτες είναι περιορισμένες. Σε προηγούμενη ερευνητική μελέτη (Μαυρογιάννη 2006), καταδείχθηκαν τα παρακάτω: (α) οι υγιείς θηλές του μαστού των προβατίνων παρέχουν αποτελεσματική προστασία στο μαστικό αδένος κατά των παθογόνων μικροοργανισμών, (β) η διαδικασία άρμεξης προδιαθέτει στην είσοδο βακτηρίων στη θηλή του μαστού, όμως η είσοδος τους σε αυτή δεν οδηγεί σε αύξηση της πιθανότητας διείσδυσής τους στο μαστικό παρέγχυμα, (γ) ο λεμφικός ιστός στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου φαίνεται ότι αποτελεί σχηματισμό με σημαντική αμυντική δραστηριότητα, (δ) οι παθήσεις των θηλών του μαστού προδιαθέτουν τις προβατίνες σε μαστίτιδα.

Τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης έδωσαν το έναυσμα για την επέκταση της μελέτης και την πραγματοποίηση σειράς περαιτέρω πειραματισμών, για τη διερεύνηση του ρόλου της θηλής του μαστού στην παθογένεια της μαστίτιδας. Η παρούσα διατριβή εστιάζεται στη μελέτη της σημασίας της θηλής του μαστού των προβάτων στην παθογένεια της μαστίτιδας. Ειδικότερα, η διατριβή αποσκοπεί:

- Στη διαλεύκανση των διεργασιών που λαμβάνουν χώρα στο αρχικό στάδιο της μόλυνσης του μαστού των προβάτων, ιδιαίτερα σε σχέση με την είσοδο των βακτηρίων στη θηλή του μαστού.
- Στη μελέτη του πιθανού ρόλου της υπάρχουσας στη θηλή του μαστού βακτηριακής χλωρίδας.
- Στην αξιολόγηση της αντίδρασης του ζώου κατά την οξεία φάση της μόλυνσης.
- Στη διαπίστωση των κυτταρικών υποπληθυσμών στη θηλή του μαστού.

- Στη μελέτη του πιθανού ρόλου των λεμφοκυττάρων στην προστασία του μαστικού αδένου.

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στην Κλινική Μαιευτικής και Αναπαραγωγής του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η ερευνητική εργασία που περιγράφεται διήρκεσε από το φθινόπωρο του 2004 έως το καλοκαίρι του 2007 και η συγγραφή της διατριβής έλαβε χώρα κατά το 2008.

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον επιβλέποντα αυτής της διατριβής, καθηγητή κ. Γ.Χ. Φθενάκη, για την αμέριστη στήριξη και καθοδήγησή του καθόλη της διάρκειας εκπόνησής της. Με τη συνεχή βοήθεια και τις εύστοχες συμβουλές του, έθεσε τις βάσεις της επαγγελματικής σταδιοδρομίας μου, εξασφαλίζοντάς μου εφόδια, ευκαιρίες και εμπειρίες πολύτιμες για κάθε νέο επιστήμονα. Η συνεργασία μας αποτελεί για εμένα σημείο αναφοράς.

Ευχαριστώ τον καθηγητή της Κτηνιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης κ. Κ. Μπόσκο, για τις υποδείξεις του καθόλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής. Επίσης, ευχαριστώ τον αναπληρωτή καθηγητή της Κτηνιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης κ. Ν. Παπαϊωάννου, ο οποίος είχε την όλη επίβλεψη και επιμέλεια της εκτέλεσης και αξιολόγησης των ιστοπαθολογικών - ανοσοϊστοχημικών μελετών που παρουσιάζονται στη διατριβή αυτή.

Ευχαριστίες επίσης απευθύνω:

Στον επίκουρο καθηγητή της Κτηνιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου του Liverpool κ. P. Cripps, για τη βοήθεια στη διαχείριση και την ανάλυση των δεδομένων των πειραματισμών.

Στον ερευνητή του Ινστιτούτου Moredun της Σκωτίας κ. M. Dagleish, για την όλη βοήθεια και καθοδήγηση στη διάρκεια της παραμονής μου εκεί.

Στον καθηγητή κ. Η. Κυριαζάκη, για την όλη υποστήριξη και τις συμβουλές του στη διάρκεια της εκπαίδευσής μου.

Στον αναπληρωτή καθηγητή του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Γκόβαρη, για την παραχώρηση χρήσης εξοπλισμού.

Στον αναπληρωτή καθηγητή κ. Γ. Αμοιρίδη, για τη βοήθειά του σε θέματα κλινικής πράξης στη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής.

Στο λέκτορα της Κτηνιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης κ. Χ. Βερβερίδη για τη βοήθειά του στην παρασκευή και εκτίμηση των επιχρισμάτων αίματος, για όλες

τις συμβουλές και την υποστήριξή του, καθώς και για την καθοδήγησή του σε θέματα κλινικής πράξης.

Στη διδάσκουσα του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Β. Μαυρογιάννη για την καθοδήγησή της και τη βοήθειά της στην λήψη και την αξιολόγηση των δειγμάτων.

Στο συνάδελφο κ. Δ. Γκουγκουλή για την αμέριστη βοήθειά του στη διεξαγωγή των πειραματικών μελετών.

Στη συνάδελφο κ. Δ. Ορφανού για την αμέριστη βοήθειά της σε θέματα αιματολογικών εξετάσεων και για την αγαστή συνεργασία μας.

Στην κ. J. Finlayson του Ινστιτούτου Moredun της Σκωτίας για την όλη βοήθεια σε τεχνικά θέματα κατά την εκεί παραμονή μου.

Στην καθηγήτρια του Τμήματος Ζωικής Παραγωγής του Τεχνολογικού Εκπαιδευτικού Ιδρύματος Ηπείρου κ. Α. Τζώρα, για την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών στη διάρκεια των πειραματισμών.

Στο λέκτορα του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Ν. Σολωμάκο, για τη βοήθειά του στην ανάλυση των δειγμάτων γάλακτος.

Στον αναπληρωτή καθηγητή του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Χ. Μπιλλίνη, για την παραχώρηση χρήσης εξοπλισμού και για την ιολογική εξέταση δειγμάτων.

Στην αναπληρώτρια καθηγήτρια του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Α. Ρόδη, για την παραχώρηση χρήσης εξοπλισμού.

Στο διευθυντή του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του Ινστιτούτου Moredun της Σκωτίας κ. D. Buxton και στη γενική διευθύντρια του Ινστιτούτου Moredun της Σκωτίας κ. Julie Fitzpatrick για τη φιλοξενία στο ίδρυμα αυτό.

Στον αναπληρωτή καθηγητή του Τμήματος Ζωικής Παραγωγής του Τεχνολογικού Εκπαιδευτικού Ιδρύματος Ηπείρου κ. Ι. Σκούφο, για τη βοήθειά του.

Στη λέκτορα του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Π. Γκουλέτσου, για την βοήθειά της σε θέματα υπερηχοτομογραφικής εξέτασης του μαστού.

Στον αναπληρωτή καθηγητή του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Ι. Παππά, για την παραχώρηση χρήσης εξοπλισμού.

Στις διδάσκουσες του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Λ. Αθανασίου και κ. Ε. Βαλάση, για τη βοήθειά τους.

Στους συναδέλφους κ.κ. Δ. Δούκα και Φ. Λυκοτραφίτη, για τη βοήθειά τους στις νεκροτομές των ζώων.

Στο συνάδελφο κ. Σ. Μαυρίδη, για την παρασκευή διαλυμάτων απαραίτητων στις πειραματικές μελέτες.

Στη συνάδελφο κ. Μ. Σοφία, για την εξέταση δειγμάτων.

Στην παρασκευάστρια του Τμήματος Ζωικής Παραγωγής του Τεχνολογικού Εκπαιδευτικού Ιδρύματος Ηπείρου κ. Κ. Φώτου, για την παρασκευή μικροβιολογικών υποστρωμάτων.

Στον κ. Α. Τρούκη και την κ. Φ. Ριζάβα, για τη φροντίδα των πειραματοζώων και τη βοήθειά τους στις δειγματοληψίες.

Τέλος, ευχαριστώ ιδιαίτερα τους γονείς μου και τις αδελφές μου, που πάντα με αγάπη, υπομονή και πίστη στις δυνατότητες μου, αποτελούν κινητήρια δύναμη για την επίτευξη στόχων, καθώς επίσης και το σύντροφό μου, που είναι δίπλα μου σε κάθε βήμα μου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

A. ΜΑΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΚΑΙ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΘΗΛΗΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΤΩΝ ΠΡΟΒΑΤΩΝ

Οι προβατίνες έχουν δύο μαστικούς αδένες, οι οποίοι βρίσκονται στη βουβωνική χώρα και έχουν ημισφαιρικό σχήμα (Μιχαήλ 1990). Μεταξύ των δύο αδένων υπάρχει ευδιάκριτη και αβαθής αύλακα (*sulcus intermammarius*). Οι δύο μαστικοί αδένες ενώνονται μεταξύ τους σε ενιαία ογκώδη μάζα, το μαστό (*uber*) (May 1970, Μιχαήλ 1990, Schummer, Wilkens, Vollmerhaus & Habermehl 1981), ο οποίος αποτελεί ενιαίο ανατομικό μόρφωμα και περιλαμβάνει τους δύο μαστικούς αδένες και τις θηλές.

Ο μαστικός αδένας προέρχεται από το εξώδερμα. Η ανάπτυξή του αρχίζει ήδη από την εμβρυϊκή ζωή των προβατίνων. Ο πρώτος πρόδρομος σχηματισμός του μαστικού αδένος είναι η μαστική γραμμή (*milk line*). Η μαστική γραμμή εμφανίζεται από την 30ή έως την 33η ημέρα της εμβρυϊκής ζωής (Martinet 1962, Raynaud 1971) και μετά από διαδοχικές μεταβολές, απολήγει στη δημιουργία των ανατομικών μορφωμάτων του μαστού.

Το δέρμα του μαστού αποτελεί συνέχεια του δέρματος της κοιλιάς και είναι λεπτό, ελαστικό, λιπαρό και καλύπτεται από λεπτές τρίχες. Κάτω από το δέρμα του μαστού υπάρχει η μαστική περιτονία, η οποία σχηματίζει μία πλήρη θήκη γύρω από κάθε μαστικό αδένος και ενώνεται κατά μήκος της μέσης ραφής με τη μαστική περιτονία του ετερόπλευρου αδένος. Έτσι σχηματίζεται το μεσομαστικό διάφραγμα, το οποίο χωρίζει τους δύο μαστικούς αδένες. Το έσω πέταλο της μαστικής περιτονίας (*lamina medialis*) προσφύεται στην κοιλιακή επιφάνεια της ηβοϊσχιακής σύμφυσης του προηβικού τένοντα. Το έσω πέταλο της μαστικής περιτονίας κάθε μαστικού αδένος του ζώου συνδέεται με αυτό του ετερόπλευρου αδένος, σχηματίζοντας τον αναρτήρα σύνδεσμο του μαστού (*ligamentum suspensorium uberis*) (Μιχαήλ 1990, Schummer και συν. 1981). Το έξω πέταλο της μαστικής περιτονίας (*lamina lateralis*) καλύπτει την έξω επιφάνεια των μηρών και την επιπολής περινεϊκή περιτονία. Από την εν τω βάθει στοιβάδα του έσω και του έξω πετάλου εκπορεύονται πολυάριθμα αναρτήρια πέταλα προς το παρέγχυμα του μαστικού αδένος (μαστικό παρέγχυμα). Τα παραπάνω ινοελαστικά στοιχεία αποτελούν τη συσκευή ανάρτησης του μαστού (Μιχαήλ 1990). Οι σύνδεσμοι του δέρματος του μαστού ενώνονται στη βάση της θηλής του και εξαφανίζονται στο τοίχωμά της (Schummer και συν. 1981).

Στην κορυφή του σώματος του μαστικού αδένος υπάρχει η θηλή (*papilla mammae*). Η θηλή του μαστού έχει σχήμα κωνικό και φέρεται κεφαλικά με κλίση 42,5 ° από την κατακόρυφη

γραμμή (Hatziminaoglou, Zervas, Hatziminaoglou & Sinapis 1984). Η θηλή έχει μήκος 2 έως 2,5 cm σε προβατίνες φυλών κρεοπαραγωγικής κατεύθυνσης (Turner 1952) και 3 έως 3,5 cm σε προβατίνες φυλών γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης (Hatziminaoglou και συν. 1984). Στο ελεύθερο άκρο της θηλής του μαστού βρίσκεται το στόμιό της (*ostium papillarae*).

Το τοίχωμα της θηλής του μαστού αποτελείται από τα εξής στρώματα (από έξω προς τα έσω): το εξωτερικό τοίχωμα - δέρμα, την ινομυώδη αγγειοφόρο στιβάδα και το εσωτερικό τοίχωμα - επιθήλιο του βλεννογόνου του θηλαίου πόρου ή του θηλαίου κόλπου (Hamann & Burvenich 1994). Το δέρμα εξωτερικά καλύπτεται από πολύ λεπτές τρίχες και περιέχει καλά αναπτυγμένους ιδρωτοποιούς και σμηγματογόνους αδένες. Το επιθήλιο της επιδερμίδας είναι πολύστοιβο πλακώδες κερατινοποιημένο (Μιχαήλ 1990, Monteiro-Riviere, Stinson & Calhoon 1993). Σε αντίθεση με το δέρμα του μαστού, που είναι ελαφρά προσκολλημένο στους υποκείμενους ιστούς του και μπορεί να μετακινείται εύκολα, το δέρμα της θηλής είναι ακίνητο και ισχυρά προσκολλημένο στο υποκείμενο μυϊκό στρώμα. Η επιφάνειά του είναι διαμορφωμένη, ώστε να αντέχει στη μηχανική πίεση, που ασκείται κατά το θηλασμό ή την άρμεξη.

Εκτενείς μελέτες της μακροσκοπικής ανατομικής και της ιστολογίας της θηλής του μαστού έχουν πραγματοποιηθεί στις αγελάδες. Στα ζώα αυτά, η επιδερμίδα της θηλής είναι ιδιαίτερα παχιά (1 mm) και προστατεύεται από την κεράτινη στοιβάδα του δέρματος, η οποία αποτελεί συμπαγές στρώμα πάχους 100 μm. Επιπρόσθετα, το υποκείμενο τμήμα της κεράτινης στοιβάδας είναι έντονα θηλώδες (Hibbitt 1984). Οι θηλωματοειδείς προσεκβολές της επιδερμίδας (*papillae*) αυξάνουν την επιφάνεια διάχυσης των θρεπτικών συστατικών και των επιβλαβών στοιχείων που διαπερνούν τους ιστούς της θηλής (Hibbitt 1984). Οι Schulz, Michel και Seffner (1974) ανέφεραν την ύπαρξη ενός δικτύου ελαστικών και λείων μυϊκών ινών στο θηλαίο πόρο των αγελάδων. Με βάση το πρότυπο αυτό, η κατεύθυνση αυτών των ινών μεταβάλλεται ανάλογα με την απόστασή τους από το στόμιο της θηλής. Η επιδερμίδα της θηλής του μαστού είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη, καθώς περιέχει πολλές αισθητικές νευρικές απολήξεις που προέρχονται από το οσφυϊκό νεύρο και καταλήγουν σε βάθος 200 μm από την εξωτερική επιφάνεια. Μέσω αυτών, μεταφέρονται νευρικές ώσεις στο κεντρικό νευρικό σύστημα, με αποτέλεσμα την έκλυση της ωκυτοκίνης και τη μεταφορά της στο μαστικό αδένα όπου δρα στα μυοεπιθηλιακά κύτταρα. Στα βαθύτερα στρώματα του δέρματος υπάρχει πυκνό κολλαγόνο, που περιβάλλει δεσμίδες λείων μυϊκών ινών (Hamann & Burvenich 1994). Η ινομυώδης αγγειοφόρος στιβάδα του τοιχώματος της θηλής αποτελεί περίπου τα δύο τρίτα του. Σε αυτήν περιλαμβάνονται τα αγγεία της θηλής, δηλαδή αρτηρίες, αρτηριοφλεβικές αναστομώσεις, φλέβες και λεμφαγγεία. Στη στιβάδα αυτή έχει περιγραφεί ένα δίκτυο λείων μυϊκών ινών, οι οποίες κατανέμονται κυκλοτερώς και επιμήκως στο τοίχωμα της θηλής, ξεκινώντας από τη βάση της και

καταλήγοντας στο κάτω άκρο της (Hamann & Burvenich 1994). Οι ίνες αυτές ελέγχουν το άνοιγμα και το κλείσιμο της θηλής.

Το στόμιο της θηλής του μαστού απολήγει εσωτερικά στο θηλαίο πόρο (*ductus papillaris*), ο οποίος στις προβατίνες έχει μήκος 3 έως 8 mm (Φθενάκης 1993). Στις αγελάδες, το μέσο μήκος του είναι περίπου 10 mm (3-18 mm) (McDonald 1973, Hamann 1987, Geishausher & Querengasser 2000, Paulrud & Rasmussen 2004), ανάλογα με τη φυλή και το στάδιο της γαλακτικής περιόδου του ζώου (McDonald 1973). Το μέσο πάχος του επιθηλίου του θηλαίου πόρου των αγελάδων κυμαίνεται από 327 ± 6 μm (Uppal, Singh, Nauriyal & Bansal 1994) έως 550 ± 20 μm (Comalli, Eberhart, Griel & Rotheabacher 1984), επίσης ανάλογα με τη φυλή και το στάδιο της γαλακτικής περιόδου. Η διάμετρος του θηλαίου πόρου ποικίλλει από 0,35 έως 5,0 mm, με μέση τιμή 2 mm (Hamann 1987). Το μήκος και η διάμετρος του θηλαίου πόρου καθορίζουν το ρυθμό ροής του γάλακτος (Baxter, Clarke, Dodd & Foot 1950). Σημειώνεται ότι ανάλογη εκτεταμένη βιβλιογραφία δεν υπάρχει για τη θηλή του μαστού των προβατίνων.

Στις αγελάδες, ο θηλαίος πόρος καλύπτεται από πολύστοιβο πλακώδες επιθήλιο, το οποίο σε ορισμένα σημεία εμφανίζει μία πολυδαίδαλη εικόνα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία πτυχών, οι οποίες ενώνονται στο κέντρο του πόρου. Το χόριο του βλεννογόνου περιέχει πολλές ελαστικές μυϊκές ίνες και ελάχιστες λείες (Hibbitt 1984, Φθενάκης 1993). Στο θηλαίο πόρο απολήγει ο θηλαίος κόλπος (*sinus papillaris*), ο οποίος καλύπτεται από δίστοιβο κυλινδρικό επιθήλιο. Ο βλεννογόνος του θηλαίου πόρου συχνά έχει σκούρο χρωματισμό και στο ανώτερο σημείο του είναι σαφώς διαχωρισμένος από το θηλαίο κόλπο μέσω κάποιων πτυχών, οι οποίες σχηματίζουν ένα εσωτερικό στόμιο. Παραδοσιακά, το μόρφωμα αυτό αποκαλείται "δακτύλιος του Furstenberg" (*Furstenberg's rosette*) (Hibbitt 1984). Στην περιοχή αυτή, τα κύτταρα της επιφάνειας γίνονται πιο στρογγυλά και εξέχοντα, με αραιές μικρολάχνες. Στο σημείο αυτό, στη θηλή του μαστού των αγελάδων έχει περιγραφεί ένας "λεμφοεπιθηλιακός ιστός" (*lymphoepithelium*), με αμυντική δράση έναντι των αντιγόνων που εισβάλλουν στην περιοχή (Hibbitt 1984).

Ο Hibbitt (1984) πραγματοποίησε την πρώτη αναφορά για παρουσία λεμφικού τύπου ιστού στη θηλή του μαστού των αγελάδων. Στις προβατίνες, πρόσφατα, αναφέρθηκε η παρουσία περιοχών συνάθροισης λεμφοκυττάρων, με εικόνα χαρακτηριστική λεμφοζιδίου, με ή χωρίς ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα και βλαστική δραστηριότητα (Μαυρογιάννη 2006) στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου. Σε μία σειρά άρθρων (Mavrogianni, Fthenakis, Brooks, Papaioannou, Cripps, Taitzoglou, Brellou & Saratsis 2005, Mavrogianni, Cripps, Papaioannou, Taitzoglou & Fthenakis 2006, Mavrogianni, Cripps, Brooks, Taitzoglou &

Fthenakis 2007) τεκμηριώθηκε ο προστατευτικός ρόλος αυτών των σχηματισμών έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών.

Στις αγελάδες, υπάρχουν αρκετές ενδείξεις που συνηγορούν στην άποψη ότι υπάρχει μια περιοχή του θηλαίου πόρου που δρα ως σφιγκτήρας μυς. Το μεγαλύτερο τμήμα των λείων μυϊκών ινών ολόκληρης της θηλής του μαστού κατανέμεται σε σπειροειδείς ή κωνοειδείς σύμπλεγμα μυϊκών ινών, το οποίο ξεκινά από τη βάση της θηλής και καταλήγει στο θηλαίο πόρο. Αυτό το σύμπλεγμα δρα ως σφιγκτήρας, κλείνοντας το θηλαίο πόρο, ώστε οι τυχόν διαρροές γάλακτος ή η είσοδος μικροβίων να είναι ελάχιστες (Hamann & Burvenich 1994). Ο τόνος του σφιγκτήρα διατηρείται με ώσεις από το συμπαθητικό νευρικό σύστημα (Peeters, Coussens & Sierens 1949). Στις προβατίνες, δεν υπάρχει μυς σφιγκτήρας της θηλής, η σύγκλειση της οποίας επιτυγχάνεται με ελαστικό ιστό (Schummer και συν. 1981, Μιχαήλ 1990).

Στο θηλαίο κόλπο απολήγει ο γαλακτοφόρος κόλπος (*sinus lactiferous*) του μαστικού αδένος, ο οποίος έχει ακανόνιστο σχήμα, μέγεθος φουντουκιού και καλύπτεται από δίστοιβο κυλινδρικό επιθήλιο. Ένα τμήμα του γαλακτοφόρου κόλπου βρίσκεται μέσα στη θηλή (*pars papillaris*) και το υπόλοιπο μέσα στο σώμα του μαστικού αδένος (*pars glandularis*).

Η παροχή αίματος στο μαστικό αδένος γίνεται από την έξω αιδοϊκή αρτηρία, κλάδοι της οποίας είναι η οπίσθια, η μέση και η κεφαλική μαστική αρτηρία. Η μέση μαστική αρτηρία διακλαδίζεται στις θηλαίες αρτηρίες, οι οποίες καταλήγουν στο αρτηριακό πλέγμα του θηλαίου πόρου (Linzell 1971, Schummer και συν. 1981). Οι θηλαίες αρτηρίες εκτείνονται από τη βάση της θηλής του μαστού μέχρι την άκρη της, στην εσωτερική επιφάνεια του τοιχώματός της (Schummer και συν. 1981). Η κυκλοφορία του τοιχώματος της θηλής εμφανίζει πολυάριθμες αρτηριοφλεβικές αναστομώσεις. Το φλεβικό αίμα απάγεται μέσω των θηλαίων φλεβών, της μέσης μαστικής φλέβας, της κεφαλικής μαστικής φλέβας και της έξω αιδοϊκής φλέβας στην πρόσθια επιπολής επιγάστρια φλέβα (May 1970, Linzell 1971, Schalm και συν. 1971, Schummer και συν. 1981). Οι θηλαίες φλέβες παροχετεύονται στο φλεβικό δακτύλιο, ο οποίος είναι ένα κυκλικό μόρφωμα από φλέβες εντοπισμένο στη βάση της θηλής. Οι θηλαίες φλέβες έχουν παχύ και ιδιαίτερα αναπτυγμένο μυϊκό τοίχωμα, ώστε να μπορούν να διατηρήσουν τη ροή του αίματος κατά τη διάρκεια του θηλασμού και της άρμεξης, οπότε οι θηλές του μαστού υπόκεινται σε μεγάλες πιέσεις (Schummer και συν. 1981). Οι Hamann και Burvenich (1994) ανέφεραν ότι κατά τη στιγμή της άρμεξης, η ροή αίματος στις θηλές των αγελάδων αυξανόταν κατά δύο έως τρεις φορές.

Στο μαστικό αδένος υπάρχουν οκτώ έως δώδεκα μεγάλα απαγωγά λεμφαγγεία, τα οποία εκβάλλουν στα μαστικά (ή οπισθομαστικά ή υπερμαστικά) λεμφογάγγλια (*lymphonodi mammary*) (Lee & Lascelles 1969), τα οποία αποτελούν τα επιχώρια λεμφογάγγλια του οργάνου και

συνήθως είναι δύο σε κάθε πλευρά. Το λεμφικό σύστημα της θηλής του μαστού αποτελείται από ένα επιφανειακό και ένα βαθύ δίκτυο (Hampl & Jelinek 1971). Τα λεμφικά τριχοειδή αγγεία του δέρματος της θηλής εμφανίζουν ένα πολυγωνικό δίκτυο στο χόριο. Τα αγγεία αυτά διαπερνούν τα βαθιά στρώματα του χορίου και συναντούν την ινομυώδη αγγειοφόρο στιβάδα του τοιχώματος της θηλής, όπου συνδέονται με λεμφαγγεία μέσης διαμέτρου 250 έως 300 μm . Αυτά τελικά ενώνονται με μεγαλύτερες φλέβες διαμέτρου μεγαλύτερης από 1 mm, οι οποίες διατρέχουν το μέσο του τοιχώματος της θηλής σε επιμήκη κατεύθυνση. Αυτό το μεγάλο λεμφικό πλέγμα της θηλής (*lymphatic corpus cavernosum*) συντελεί στη διόγκωση των θηλών κατά τη διάρκεια του θηλασμού ή της άρμεξης (Tagand 1932).

Στις προβατίνες, τα μαστικά λεμφογάγγλια παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοσολογική ανταπόκριση του μαστικού αδένος μετά από μόλυνση (Outteridge, Rock & Lascelles 1965, Lee & Lascelles 1970, Colditz & Watson 1982, Watson 1980, Watson 1984). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι σε μελέτες για τη διαδρομή της λέμφου που απάγεται από το μαστικό παρέγχυμα, αποδείχθηκε ότι δεν υπήρχε επικοινωνία μεταξύ των λεμφογαγγλίων των δύο μαστικών αδένων (Heath & Kerlin 1986). Καθώς κάποια συστατικά της λέμφου (λευκοκύτταρα, κυτοκίνες) έχουν ανοσορρυθμιστικό ρόλο, το γεγονός αυτό έχει σημασία στην εξέλιξη των ανοσολογικών αντιδράσεων μετά από την είσοδο αντιγονικού ερεθίσματος σε κάποιο μαστικό αδένος.

B. ΑΜΥΝΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΗ ΘΗΛΗ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Εισαγωγή

Η θηλή του μαστού εμποδίζει την εκροή γάλακτος από το μαστικό αδένα και την είσοδο των μικροοργανισμών σε αυτόν. Συνεπώς, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην άμυνα του μαστού κατά των μολύνσεων. Σημειώνεται ότι το μεγαλύτερο μέρος της σχετικής βιβλιογραφίας αναφέρεται στο μαστό των αγελάδων. Μολαταύτα παρατίθεται εδώ, καθώς η αντίστοιχη βιβλιογραφία για τις προβατίνες είναι ιδιαίτερα περιορισμένη.

Ο αμυντικός ρόλος της θηλής του μαστού συνίσταται κατά πρώτον στη δημιουργία ενός μηχανικού φραγμού στην είσοδο των βακτηρίων (Craven & Williams 1985, Paape, Schultze & Guidry 1985). Το σχήμα, το μέγεθος και η διάμετρος της θηλής θεωρείται ότι αποτελούν προδιαθέτοντες παράγοντες για τη μαστίτιδα, είτε αυτοί καθαυτοί, είτε σε σχέση με τη διαδικασία άρμεξης (Dodd & Neave 1951, Grindal, Walton & Hillerton 1992, Lacy-Hulbert & Hillerton 1995). Έτσι, έχει βρεθεί ότι η διάμετρος του θηλαίου πόρου ευπρόσβλητων μαστικών αδένων ήταν μεγαλύτερη από εκείνη ανθεκτικών μαστικών αδένων (Plommet 1960, Franz, Hofmann-Parisot, Gutler & Baumgartner 2003). Πολλές μελέτες συσχετίζουν τα ανατομικά χαρακτηριστικά της θηλής των αγελάδων με την ανάπτυξη υποκλινικής μαστίτιδας (Rathore 1976, Rathore 1977, Jorstad 1989).

Η αποτελεσματικότητα των αμυντικών μηχανισμών της θηλής του μαστού εξαρτάται άμεσα από την ακεραιότητα των ιστών της. Γενικά, θεωρείται ότι αλλοιώσεις στο κάτω άκρο της θηλής και στο στόμιό της αυξάνουν την πιθανότητα ενδομαστικής μόλυνσης (Farnsworth 1996). Οι αλλοιώσεις αυτές διακρίνονται σε λοιμώδους ή μη λοιμώδους αιτιολογίας.

Στις λοιμώδους αιτιολογίας αλλοιώσεις των θηλών, περιλαμβάνονται παθολογικές καταστάσεις, όπως η θηλωμάτωση, το λοιμώδες έκθυμα και η ευλογιά. Στις αγελάδες έχει τεκμηριωθεί η συσχέτιση μεταξύ παθήσεων των θηλών και μαστίτιδας (Saloniemi & Roine 1981, Witzig, Rusch & Berchtold 1984, Neijenhuis, Barkema, Hogeveen & Noordhuizen 2001). Σε κλινικές μελέτες σε προβατίνες, αναφέρεται συσχέτιση παθήσεων των θηλών και μαστίτιδας (Doherty & Bassett 1989, Gunning & Bosworth 1989, Onash, Healy, Brophy, Kinsella & Doherty 2003, Quinney, Davison & Bebbington 2003, Mavrogianni & Fthenakis 2007). Μολαταύτα, άλλοι συγγραφείς (Watkins, Burriel & Jones 1991, Al-Majali & Jawabreh 2003) ανέφεραν απουσία συσχέτισης μεταξύ μαστίτιδας και παθήσεων των θηλών σε προβατίνες. Όμως, σε πειραματικές μελέτες σχετικά με την ευαισθησία των θηλών με αλλοιώσεις στην εκδήλωση μαστίτιδας από

Mannhemia haemolytica σε προβατίνες, διαπιστώθηκε η συσχέτιση αλλοιώσεων των θηλών με εκδήλωση μαστίτιδας (Mavrogianni, Cripps και συν. 2006).

Στις μη λοιμώδους αιτιολογίας αλλοιώσεις των θηλών, συγκαταλέγονται τραυματισμοί κατά την άρμεξη, εκφύλιση των ιστών της θηλής του μαστού λόγω διαταραχών αιμάτωσης κατά την άρμεξη, ανωμαλίες στο στόμιο της θηλής, αλλοιώσεις στο δέρμα της θηλής λόγω αντίξοων καιρικών συνθηκών (χαμηλή θερμοκρασία, άνεμος) ή ως συνέπεια κακής αρμεκτικής τεχνικής, και αλλοιώσεις του δέρματος της θηλής από χημικές ουσίες (π.χ. απολυμαντικά) (Francis 1984, Sieber & Farnsworth 1984).

Η αντίδραση των ιστών της θηλής του μαστού των αγελάδων στη μηχανική άρμεξη έχει μελετηθεί εκτενώς (McDonald 1975, Schultze & Bright 1983, Hamann & Duck 1984, O'Shea, O'Callaghan & Meaney 1987, Persson 1991, Bramley 1992). Η συμφόρηση και το οίδημα των ιστών της θηλής (κυρίως στο κάτω άκρο της), η αλλαγή της διαμέτρου και της διαπερατότητας του θηλαίου πόρου είναι κάποιες από τις αρνητικές επιπτώσεις της υπερβολικής ή κακής μηχανικής άρμεξης. Ωστόσο, η θηλή πλήττεται κυρίως από διαταραχές στην υδροδυναμική των ιστών της, οι οποίες περαιτέρω επηρεάζουν τους αμυντικούς μηχανισμούς της. Για παράδειγμα, η μειωμένη αιμάτωση λόγω της ασκούμενης κατά την άρμεξη πίεσης, συντελεί αφενός στην πιο αργή σύγκλειση του θηλαίου πόρου και αφετέρου στην μειωμένη είσοδο λευκοκυττάρων στην περιοχή (Paulrud 2005).

Ο ρόλος της κερατίνης του θηλαίου πόρου

Η κερατίνη, που καλύπτει το βλεννογόνο του επιθηλίου του θηλαίου πόρου, παίζει πρωτεύοντα ρόλο στην αναχαίτιση της ανόδου των βακτηρίων από τη θηλή στο μαστικό αδέν. Η κερατίνη συμμετέχει στην τοπική άμυνα στη θηλή, μέσω της διαδικασίας προσρόφησης, από τα κερατινοποιημένα κύτταρα, των βακτηρίων που εισέρχονται στον πόρο της θηλής, ως επακόλουθο της αποφολίδωσης αυτής κατευατής (δηλαδή της κερατίνης) κατά την άρμεξη (Williams & Mein 1985). Επιπλέον, κατά την ξηρή περίοδο, η κερατίνη κλείνει ολοκληρωτικά το θηλαίο πόρο, προστατεύοντας έτσι αποτελεσματικά το μαστικό αδέν (Nickerson 1987). Η πρώτη αναφορά για τη σπουδαιότητα της κερατίνης του θηλαίου πόρου της αγελάδας ως παράγοντα που εμποδίζει την ενδομαστική μόλυνση, έγινε από το Murphy (1959). Στη συνέχεια, αποδείχθηκε ότι η απομάκρυνση της κερατίνης μείωνε την αμυντική ικανότητα του μαστικού αδέν. στις ενδομαστικές μολύνσεις, λόγω της ευκολότερης δυνατότητας διείσδυσης μικροοργανισμών (Craven & Williams 1985, Paape και συν. 1985, Capuco, Bright, Pankey,

Wood, Miller & Bitman 1992). Τα κυτταρικά υπολείμματα απομακρύνονται μέσω του στομίου της θηλής κατά τη διάρκεια της άρμεξης, οπότε η επιφάνεια του θηλαίου πόρου συνεχώς αναγεννάται. Για την επίτευξη της μέγιστης αμυντικής ικανότητας του επιθηλίου του θηλαίου πόρου, πρέπει να διατηρείται ισορροπία στην αναλογία κερατινοποιημένων προς μη κερατινοποιημένα επιθηλιακά κύτταρα στο θηλαίο πόρο σε όλη τη διάρκεια της γαλακτοπαραγωγής (Paulrud 2005).

Η κερατίνη είναι μία ελικοειδής διμερής πρωτεΐνη, που σχηματίζει νημάτια διαμέτρου 10 nm (Paulrud 2005). Το μοριακό βάρος της κυμαίνεται από 40 έως 70 kDa (Moll, Franke, Volc-Platzer & Krepler 1982). Τα νημάτια κερατίνης υποδιαιρούνται σε δύο αλληλουχίες (I και II), οι οποίες εκφράζονται ανά ζεύγος. Η εγγενής ικανότητα αυτών των ζευγών να συνενώνονται σχηματίζοντας ελικοειδή διμερή δομή, έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μορίων με διαφορετικές βιοχημικές λειτουργίες και δράσεις (Paulrud 2005). Οι Swensson, Langbein, McMillan, Stevens, Leigh, McLean, Lane και Eady (1998) πιθανολογούν ότι οι διαφορετικοί τύποι κερατινοκυττάρων παρέχουν διαφορετικού βαθμού ανθεκτικότητα και πλαστικότητα στα επιθηλιακά κύτταρα του θηλαίου πόρου, αυξάνοντας την αντοχή τους στις φυσικές πιέσεις.

Στην κερατίνη του θηλαίου πόρου της αγελάδας έχουν ανιχνευθεί ένζυμα (κυρίως οξειδάση της ξανθίνης) με σαφή αντιβακτηριακή δράση (Collins, Parsons, Field & Bramley 1988). Επιπλέον, υπάρχουν πρωτεΐνες οι οποίες αναστέλλουν την ανάπτυξη στελεχών *Staphylococcus aureus* ή *Streptococcus agalactiae* (Hibbitt, Cole & Reiter 1969). Αυτές οι κατιονικές πρωτεΐνες της κερατίνης δεσμεύουν τα εισβάλλοντα βακτήρια, μεταβάλλοντας την τάση της κυτταρικής μεμβράνης τους, ώστε να είναι ευαίσθητα σε αλλαγές της οσμωτικής πίεσης (Senft, Meyer & Hartmann 1980).

Η λειτουργία της κερατίνης του θηλαίου πόρου ως φυσικού φραγμού που παρεμποδίζει την είσοδο των βακτηρίων στο μαστικό αδέν, οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην παρουσία λιπιδίων. Υπάρχουν αρκετές αναφορές που αποδίδουν τη βακτηριοστατική δράση της κερατίνης στα λιπίδια που περιέχει (Adams, Rickard & Murphy 1961, Adams 1962, Adams & Rickard 1963, Hogan, Pankey & Duthie 1987, Hogan, Smith, Todhunter & Schoenberger 1988). Ειδικότερα, τα λιπαρά οξέα μακράς αλύσου (μυριστικό, παλμιτικό και λινολεϊκό οξύ) έχουν βακτηριοστατικές ιδιότητες (Hogan, Duthie & Pankey 1986). Σημειώνεται πάντως ότι πολλά βακτήρια, παθογόνα για το μαστικό αδέν, επέζησαν και αναπτύχθηκαν σε *in vitro* συνθήκες, όταν χρησιμοποιήθηκε κερατίνη θηλαίου πόρου ως υπόστρωμα καλλιέργειας των βακτηρίων (Murdough, Martus, Mazzola, Salamun, Scudder, Urbano & Pankey 1991, Pankey, Murdough, Wood, Capuco & Bitman 1995). Εκτενείς ανασκοπήσεις των αλληλεπιδράσεων βακτηρίων - κερατίνης έχουν δημοσιευτεί από το Williams (1984) και τους Williams και Mein (1985).

Όσα βακτήρια επιβιώσουν από τον προστατευτικό χαρακτήρα της κερατίνης, διεισδύουν και επιχειρούν να αποικιοποιήσουν το θηλαίο πόρο, στη συνέχεια δε να εισβάλλουν προς το θηλαίο κόλπο. Στα σημεία αυτά συναντούν τη δεύτερη γραμμή άμυνας, καθώς κινητοποιούνται πλέον κυτταρικοί και χυμικοί αμυντικοί μηχανισμοί (Craven & Williams 1985, Paape και συν. 1985, Caruso και συν. 1992).

Κυτταρικοί αμυντικοί μηχανισμοί

Θεωρητικά, το έκκριμα των υγιών μαστικών αδένων θα περιείχε μόνο μαστικά επιθηλιακά κύτταρα. Στην πράξη, όμως, η ύπαρξη κάποιου αριθμού λευκοκυττάρων στο μαστικό έκκριμα γίνεται αποδεκτή ως φυσιολογική (Pyorala 2003). Τα κύτταρα αυτά ονομάζονται "σωματικά κύτταρα", ακριβώς γιατί προέρχονται από την αιματική κυκλοφορία.

Αριθμός και τύπος λευκοκυττάρων στο φυσιολογικό μαστικό έκκριμα

Η περιεκτικότητα του γάλακτος των αγελάδων σε σωματικά κύτταρα έχει μελετηθεί εκτενέστατα, καθώς η αύξηση του αριθμού των λευκοκυττάρων σε αυτό αποτελεί σημαντική ένδειξη ότι ο μαστικός αδένας φλεγμαίνει. Σήμερα, η τιμή των $0,25 \times 10^6$ κυττάρων ανά mL θεωρείται φυσιολογική στο γάλα μεμονωμένων, υγιών μαστικών αδένων, ενώ η τιμή των $0,4 \times 10^6$ κυττάρων ανά mL γάλακτος θεωρείται στην Ευρωπαϊκή Ένωση ως η ανώτερη επιτρεπτή στο γάλα της εκτροφής (International Dairy Federation 2003, Pyorala 2003).

Στις προβατίνες και σχετικά με τον αριθμό των σωματικών κυττάρων του γάλακτος σε ατομικό επίπεδο (ανά ζώο), οι Berthelot, Lagriffoul, Concordet, Barillet και Bergonier (2005) πρότειναν την πραγματοποίηση διαδοχικών μετρήσεων και τη χρησιμοποίηση δύο ορίων τιμών για τη διαπίστωση των ενδομαστικών μολύνσεων. Συγκεκριμένα, ο μαστικός αδένας μπορεί να χαρακτηρίζεται "υγιής" εάν ο αριθμός των σωματικών κυττάρων βρεθεί μικρότερος από $0,5 \times 10^6$ ανά mL και "μολυσμένος" εάν ο αριθμός των σωματικών κυττάρων βρεθεί μεγαλύτερος από 1×10^6 ανά mL σε δύο τουλάχιστον διαδοχικές μετρήσεις. Σε κάθε άλλη περίπτωση, ο μαστικός αδένας χαρακτηρίζεται ως "ύποπτης κατάστασης". Περαιτέρω και με βάση τις τιμές αυτές, υπολογίστηκε ότι αριθμός σωματικών κυττάρων $0,65 \times 10^6$ ανά mL στο γάλα της εκτροφής αντιστοιχούσε σε συχνότητα υποκλινικής μαστίτιδας 15%. Πάντως, άλλοι συγγραφείς έχουν προτείνει πολύ μικρότερες τιμές σωματικών κυττάρων στο γάλα, χαρακτηριστικές του υγιούς

μαστικού αδένος, ακόμη και $0,25 \times 10^6$ κύτταρα ανά mL (Ariznabarreta, Gonzalo & San Primitivo 2002).

Ο πιο σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει τον αριθμό των σωματικών κυττάρων στο γάλα είναι βέβαια η μόλυνση του μαστικού αδένος. Γι' αυτό και η αύξησή τους χρησιμοποιείται για τη διάγνωση της υποκλινικής μαστίτιδας. Η ανάγκη καθορισμού δύο ή και περισσότερων ανώτατων τιμών σωματικών κυττάρων πηγάζει και από τη δυναμική στη σχέση μόλυνσης - κυτταρικής αντίδρασης (Bergonier, De Cremoux, Rupp, Lagriffoul & Berthelot 2003). Για παράδειγμα, η σταφυλοκοκκική ενδομαστική μόλυνση στις προβατίνες χαρακτηρίζεται από έντονη διακύμανση στον αριθμό των σωματικών κυττάρων στο γάλα. Σύμφωνα με τους Bergonier και συν. (2003) σε περιπτώσεις υποκλινικής μαστίτιδας, η διαλείπουσα απομόνωση των υπεύθυνων βακτηρίων (Fthenakis & Jones 1990α, Fthenakis & Jones 1990β, Burriel 1997α, Saratsis, Alexopoulos, Tzora & Fthenakis 1999) είναι το αποτέλεσμα της περιοδικής εισόδου ουδετερόφιλων λευοκυττάρων στο μαστικό αδένος: όταν υπάρχει αύξηση του αριθμού σωματικών κυττάρων στο γάλα, μειώνεται αντίστοιχα η απομόνωση βακτηρίων. Καθώς λοιπόν ο αριθμός των σωματικών κυττάρων σχετίζεται με τον αριθμό και με την παθογόνο δράση των εισβαλλόντων μικροοργανισμών (Winter & Colditz 2002, Rainard 2003), η καθιέρωση δύο ανώτατων τιμών και η πραγματοποίηση διαδοχικών μετρήσεων για τον αριθμό των σωματικών κυττάρων συντελεί στην αναφορά ενός εύρους τιμών σωματικών κυττάρων στο γάλα, στο οποίο η ύπαρξη μόλυνσης είναι ενδεχόμενη (Berthelot και συν. 2005).

Όμως, υπάρχουν και ζωοτεχνικοί παράγοντες που επηρεάζουν τον αριθμό των σωματικών κυττάρων στο γάλα υγιών μαστικών αδένων. Οι πιο σημαντικοί από αυτούς είναι οι παρακάτω.

- Ο αριθμός της γαλακτικής περιόδου (ο αριθμός των σωματικών κυττάρων είναι αυξημένος σε ζώα μεγαλύτερης ηλικίας) (El-Saied, Carriero & San Primitivo 1998).
- Το στάδιο της γαλακτικής περιόδου (αμέσως μετά τον τοκετό ο αριθμός των σωματικών κυττάρων είναι αυξημένος, στη συνέχεια μειώνεται, και καθώς προχωρά η γαλακτική περίοδος αυξάνεται πάλι) (Stefanakis, Boscós, Alexopoulos & Samartzi 1995, Fthenakis 1996, Margetin, Capistrak, Spanik & Foltys 1996).
- Το μέγεθος της τοκετοομάδας (ο αριθμός των σωματικών κυττάρων είναι αυξημένος σε ζώα με ένα αρνί) (Olechnowicz & Jaskowski 2005).
- Η ποσότητα γάλακτος που παράγεται (ο αριθμός των σωματικών κυττάρων είναι αυξημένος σε ζώα με μικρότερη γαλακτοπαραγωγή) (Margetin και συν. 1996, El-Saied και συν. 1998).

- Η συχνότητα άρμεξης (ο αριθμός των σωματικών κυττάρων αυξάνεται με την αύξηση της συχνότητας της άρμεξης) (Hogeveen, Miltenburg, den Hollander & Frankena 2001, Sinapis 2007).
- Η ώρα της ημέρας (ο αριθμός των σωματικών κυττάρων είναι αυξημένος κατά την απογευματινή άρμεξη) (Fthenakis 1996).
- Το κλάσμα του γάλακτος (ο αριθμός των σωματικών κυττάρων είναι αυξημένος στις πρώτες ακτίνες γάλακτος) (Olechnowicz & Jaskowski 2002).

Σε γάλα από υγιείς μαστικούς αδένες, τα επιθηλιακά κύτταρα αποτελούν έως 3% του συνολικού αριθμού κυττάρων, τα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα 2 έως 35%, τα μακροφάγα 45 έως 85% και τα λεμφοκύτταρα 10 έως 20% (Cuccuru, Moroni, Zecconi, Casu, Caria & Contini 1997, Bergonier & Berthelot 2003, Paape, Wiggans, Bannerman, Thomas, Sanders, Contreras, Moroni & Miller 2007). Οι αναλογίες αυτές δε μεταβάλλονται ιδιαίτερα ανάλογα με το στάδιο της γαλακτοπαραγωγής. Ειδικά στο πρωτόγαλα, υπάρχουν πλασμοκύτταρα σε αναλογία έως 20% (Paape και συν. 2007), ενώ στο έκκριμα κατά την περίοδο παλινδρόμησης του μαστικού αδένος αυξάνονται τα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα (Lee & Outteridge 1981).

Σε περίπτωση οξείας μαστίτιδας, αυξάνεται η αναλογία των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων, τα οποία φτάνουν έως και στο 90% των σωματικών κυττάρων, ενώ σε χρόνια μόλυνση αυξάνεται η αναλογία των λεμφοκυττάρων (Paape και συν. 2007)

Μακροφάγα

Τα μακροφάγα στο μαστικό ιστό προέρχονται από τα μονοκύτταρα του αίματος. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό λευκοκυττάρων στο γάλα και αποτελούν τον πρώτο κυτταρικό αμυντικό μηχανισμό του μαστικού αδένος.

Στο φλεγμαίνοντα μαστικό αδένος, η αναλογία των μακροφάγων είναι μικρότερη από αυτήν των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων. Συνεπώς, στην περίπτωση αυτή, ο ρόλος των μακροφάγων είναι η διατήρηση της συνεχούς προσέλευσης των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων στο μαστικό αδένος (Outteridge & Lee 1981, Sordillo & Streicher 2002).

Στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης των μακροφάγων υπάρχει ποικιλία υποδοχέων. Κάποιοι από αυτούς συνδέονται με λιποπολυσακχαρίτες των βακτηρίων, άλλοι προωθούν την ενδοκυττάρωση λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας, ενώ άλλοι συνδέονται με γλυκοσυλιωμένες πρωτεΐνες μετά από την δράση της ιντερλευκίνης-1 ή του παράγοντα TNF (Cheville 1994).

Κύρια λειτουργία των μακροφάγων κατά την οξεία φάση της φλεγμονής είναι η φαγοκυττάρωση αντιγόνων και ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων, που έχουν οδηγηθεί σε απόπτωση (Sladek & Rysanek 2001). Τα μακροφάγα φαγοκυτταρώνουν βακτήρια και ξένα σώματα με βραδύτερο ρυθμό από τα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα. Τα αντιγόνα διατηρούνται ακέραια (δηλαδή, δεν καταστρέφονται από τα ενζυμικά συστήματα των μακροφάγων), με αποτέλεσμα τη συνέχιση των ανοσολογικών αντιδράσεων. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τη σύνθεση και την έκκριση από αυτά πλήθους ανοσοδιεγερτικών ουσιών (κυτοκίνες, χυμοκίνες, παράγοντες συμπληρώματος, πρωτεΐνες κ.ά.), έχει ως αποτέλεσμα τη συνέχιση και διαρκή ρύθμιση των ανοσολογικών αντιδράσεων (Bochsler & Slauson 2002).

Η ενεργοποίηση των μακροφάγων πραγματοποιείται υπό την επίδραση διαφόρων ανοσολογικών ερεθισμάτων. Το πρώτο από αυτά είναι τη συνάντησή τους με το αντιγόνο και ακολουθεί η φαγοκυττάρωσή του (Cheville 1994, Goldsby, Kindt, Osborne & Kuby 2003). Περαιτέρω, η ενίσχυση της δράσης των μακροφάγων συντελείται από τις κυτοκίνες, που απελευθερώνουν τα ενεργοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα, καθώς επίσης και από ποικίλης φύσης συστατικά του τοιχώματος των βακτηριακών κυττάρων. Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα εκδηλώνουν πιο έντονη και αποτελεσματική φαγοκυτταρική δράση, ενώ παράλληλα εκκρίνουν αυξημένες ποσότητες παραγόντων της φλεγμονής, οι οποίοι εντείνουν περαιτέρω τη φλεγμονώδη διαδικασία. Επιπλέον, στα ενεργοποιημένα μακροφάγα εμφανίζεται μεγαλύτερος αριθμός υποδοχέων του παράγοντα του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας 2ης τάξης (MHC-II), οπότε λειτουργούν πιο αποτελεσματικά ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (Goldsby και συν. 2003). Έτσι, τα μακροφάγα και τα Τ-λεμφοκύτταρα αλληλεπιδρούν συνεχώς κατά τη διάρκεια της φλεγμονώδους επεξεργασίας.

Ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα

Τα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα έχουν κατεξοχήν φαγοκυτταρική δράση και αποτελούν τη δεύτερη γραμμή άμυνας ενάντια στους μικροοργανισμούς που διεισδύουν στο μαστικό αδέν. Τα κύρια χαρακτηριστικά τους είναι η ταχεία αμοιβαδοειδής κίνησή τους, η έντονη φαγοκυτταρική ικανότητά τους και η παρουσία λυσοσωματικών κοκκίων ικανών για εκτενή ενδοκυτταρική πέψη συγκεκριμένων υλικών. Η αποκοκκίωσή τους οδηγεί στην απελευθέρωση ενζύμων, τα οποία στη συνέχεια προωθούνται στους ιστούς που φλεγμαίνονται. Ωστόσο, παρά την έντονη κινητικότητά τους, δεν επιβιώνουν σε περιβάλλον με ιδιαίτερα όξινο pH και αυξημένη θερμοκρασία, όπως συμβαίνει σε σημεία φλεγμονής.

Η Persson (1992) βρήκε ότι η εισροή ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων στη θηλή του μαστού των προβατίνων λαμβάνει χώρα 30 έως 60 min μετά την είσοδο των βακτηρίων, η δε μεγαλύτερη συγκέντρωσή τους επιτυγχάνεται 2 ώρες αργότερα. Όμως, οι El-Masannat, Jones και Scott (1991) διαπίστωσαν σημαντική αύξηση του αριθμού των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων 12 ώρες μετά από απευθείας ενοφθαλμισμό βακτηρίων στο γαλακτοφόρο κόλπο. Αυτή η διαφορά στο χρόνο εμφάνισης των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων στη θηλή ή στο μαστικό παρέγχυμα αποδεικνύει τον προστατευτικό ρόλο της θηλής.

Τα λυσοσωματικά κοκκία των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων είναι διαφόρων ειδών, αλλά ξεχωρίζουν τα αζουροφιλικά ή πρωτογενή και τα ειδικά ή δευτερογενή κοκκία. Τα αζουροφιλικά κοκκία είναι ολιγάριθμα, μεγάλα, πολύ πυκνά και περιέχουν λυσοσωμικά ένζυμα, μεταξύ των οποίων κυριαρχεί η μυελοπεροξειδάση, ενώ σε μικρότερες ποσότητες βρίσκονται η όξινη φωσφατάση, η β-γλυκουρονιδάση και η λυσοζύμη (Cheville 1994). Επίσης, περιέχουν πρωτεολυτικά ένζυμα, όπως η ελαστάση, και αντιμικροβιακές πρωτεΐνες, όπως οι ντεφενσίνες (Brown, Suter & Slauson 2002). Τα δευτερογενή κοκκία, είναι περισσότερα σε αριθμό, μεγάλα και περιέχουν αλκαλική φωσφατάση, κατιονικές πρωτεΐνες, λακτοφερρίνη, λυσοζύμη και λιπάσες. Δεν περιέχουν μυελοπεροξειδάση, ωστόσο ένα συστατικό τους, το κυτόχρωμα-β, είναι απαραίτητο για την εξέλιξη των οξειδωτικών μηχανισμών εντός του φαγολυσοσωματίου. Ειδικά τα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα των βοοειδών έχουν και τρίτο τύπο κοκκίων, τα οποία είναι μεγαλύτερα, πιο πυκνά, περισσότερα σε αριθμό και αποβάλλουν ολοκρινώς τα υλικά της ενδοκυτταρικής πέψης (Gennaro, Dewald, Horisberger, Gubler & Baggiolini 1983, Baggiolini, Horisberger, Gennaro & Dewald 1985). Στα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα υπάρχει και ένας τύπος εκκριτικών κυστιδίων με διάφορες χημικές ουσίες, κυρίως όμως υποδοχείς, όπως ο υποδοχέας συμπληρώματος 1 (CR-1), ο υποδοχέας προσκόλλησης CD11b/CD18, ο υποδοχέας ενδοτοξίνης CD14 κ.ά. Τα κυστίδια αυτά διεγείρονται πριν από τα υπόλοιπα ουδετεροφιλικά κοκκία. Έτσι, μετά την ενσωμάτωση των κοκκίων στην κυτταρική μεμβράνη, ο αριθμός των υποδοχέων στην επιφάνεια των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων αυξάνεται σημαντικά. Παράλληλα, αυξάνεται και η ικανότητα ανταπόκρισης των παραπάνω κυττάρων στα αντιγονικά ερεθίσματα (Bochsler & Slauson 2002).

Οι ειδικοί υποδοχείς στην επιφάνεια των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων αφενός πυροδοτούν και αφετέρου συντονίζουν τις κινήσεις αυτών των κυττάρων κατά τη διάρκεια της φλεγμονής. Στους υποδοχείς συμπεριλαμβάνονται μόρια, με τα οποία πραγματοποιούνται η χημειοταξία, η προσκόλληση του αντιγόνου και η φαγοκυττάρωση των βακτηρίων (Cheville 1994).

Τα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα αντιδρούν με πολλές χημειοτακτικές ουσίες πρωτεϊνικής φύσης, καθώς και με άλλες ουσίες που εκλύονται από τα κύτταρα της φλεγμονής. Επιπλέον, υπάρχουν ουσίες που απελευθερώνονται από τα ίδια τα βακτήρια και δρουν χημειοτακτικά (Cheville 1994, Mitchell & Cotran 1997). Σημαντικό ρόλο στη χημειοτακτική διαδικασία παίζουν και οι χυμοκίνες, όπως η ιντερλευκίνη-8 (IL-8) (Mitchell & Cotran 1997). Οι παράγοντες αυτοί, εκτός από τη ρύθμιση της κινητικότητας των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων, προκαλούν και άλλες αντιδράσεις που αναφέρονται γενικά ως "αντιδράσεις ενεργοποίησης των λευκοκυττάρων".

Λεμφοκύτταρα

Τα λεμφοκύτταρα βρίσκονται διάσπαρτα στον οργανισμό είτε μεμονωμένα, είτε σε περιγεγραμμένες συναθροίσεις. Χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τα Β- και τα Τ-λεμφοκύτταρα. Τα Β-λεμφοκύτταρα είναι υπεύθυνα για την παραγωγή αντισωμάτων, ρυθμίζοντας έτσι τη χυμική ανοσία, ενώ τα Τ-λεμφοκύτταρα δρουν κυρίως κατά τη διάρκεια της κυτταρικής ανοσολογικής αντίδρασης.

Σήμερα είναι γνωστό ότι η ανταπόκριση του οργανισμού σε ένα αντιγονικό ερέθισμα είναι συνάρτηση της παράλληλης δράσης και της αλληλεπίδρασης των λευκοκυττάρων του αίματος με πληθώρα διαμεσολαβητικών ουσιών/παραγόντων φλεγμονής, όπως οι κυτοκίνες και οι παράγοντες του συμπληρώματος. Η εξειδίκευση στην ανταπόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος οφείλεται στη χημική δομή των υποδοχέων της επιφάνειας των λεμφοκυττάρων. Οι υποδοχείς αυτοί δίνουν στα λεμφοκύτταρα την ικανότητα αφενός να αναγνωρίζουν τα αντιγόνα και αφετέρου να έρχονται σε επαφή με άλλα φλεγμονώδη κύτταρα, συγκροτώντας ένα σύστημα ενεργοποίησης των κυττάρων, με στόχο την εξουδετέρωση του εκάστοτε αντιγόνου. Τα τρία κύρια χαρακτηριστικά των λεμφοκυττάρων είναι (α) η αντιγονική εξειδίκευση, (β) η ποικιλία των αντιγονικών ερεθισμάτων στα οποία αυτή ανταποκρίνεται και (γ) η ανοσολογική μνήμη, σε περίπτωση νέας εισβολής του ίδιου αντιγόνου (Goldsby και συν. 2003).

Ρόλος των Β-λεμφοκυττάρων

Τα Β-λεμφοκύτταρα παράγονται και ωριμάζουν στο μυελό των οστών. Κάθε Β-λεμφοκύτταρο που μεταναστεύει από το μυελό των οστών, φέρει στην κυτταρική μεμβράνη του έναν υποδοχέα που αποτελεί το αντίσωμα της μεμβράνης του Β-λεμφοκυττάρου. Τα Β-λεμφοκύτταρα χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να συνθέτουν αντισώματα-ανοσοσφαιρίνες (IgG, IgA, IgD, IgM, IgE), που συνδέονται με συγκεκριμένα αντιγόνα. Σε

ορισμένες περιπτώσεις, οι ανοσοσφαιρίνες συντίθενται και εισέρχονται στην αιματική κυκλοφορία. Άλλοτε, παραμένουν στην επιφάνεια των ώριμων Β-λεμφοκυττάρων, οπότε όταν το κατάλληλο αντιγόνο έρθει σε επαφή μαζί τους, ενεργοποιούνται τα αντίστοιχα Β-λεμφοκύτταρα. Η ενεργοποίηση των Β-λεμφοκυττάρων απαιτεί τη συνδρομή ενός Τ-βοηθητικού λεμφοκυττάρου που αντιδρά με το ίδιο αντιγόνο (Cheville 1994, Goldsby και συν. 2003), παρότι η άμεση ενεργοποίηση των Β-λεμφοκυττάρων μετά από απευθείας επαφή τους με τμήματα μικροοργανισμών είναι επίσης δυνατή (Brown και συν. 2002, Bochsler & Slauson 2002).

Τα Β-λεμφοκύτταρα, αμέσως μετά την ενεργοποίησή τους όπως περιγράφηκε παραπάνω, υφίστανται μιτωτική διαίρεση και παράγουν νέα Β-λεμφοκύτταρα (κλώνους), τα οποία συνθέτουν πλέον ανοσοσφαιρίνες με εξειδίκευση για το συγκεκριμένο αντιγόνο. Αυτά τα νέα Β-λεμφοκύτταρα (κλώνοι) στην πλειονότητά τους ωριμάζουν και στη συνέχεια μετατρέπονται σε "πλασμοκύτταρα". Αυτά είναι ικανά να συνθέτουν και να εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες ελεύθερων ανοσοσφαιρινών, με εξειδίκευση για το συγκεκριμένο αντιγόνο (Goldsby και συν. 2003). Τα πλασμοκύτταρα δραστηριοποιούνται κυρίως στους ιστούς. Για την ενεργοποίηση και μετατροπή των Β-λεμφοκυττάρων σε πλασμοκύτταρα, απαιτείται η δράση ιντερλευκινών που εκκρίνονται από τα Τ-λεμφοκύτταρα. Πλασμοκύτταρα έχουν ανιχνευθεί στο μαστικό ιστό και στις θηλές των αγελάδων (Collins & Oldham 1986, Doymaz, Sordillo, Oliver & Guidry 1988) και των προβατίνων (Mavrogianni και συν. 2005).

Όταν τα Β-λεμφοκύτταρα έρχονται σε επαφή με το αντιγόνο για πρώτη φορά, προκαλείται η "πρωτογενής ανοσολογική αντίδραση" (Κοπτόπουλος 1993). Τα νέα Β-λεμφοκύτταρα (κλώνοι) που απομένουν μετά την καταστολή της φλεγμονής, μετατρέπονται σε "κύτταρα μνήμης", δηλαδή λεμφοκύτταρα που έχουν μεγάλη διάρκεια ζωής και μπορούν να αντιδράσουν άμεσα σε ενδεχόμενη νέα εισβολή του ίδιου αντιγόνου (δηλαδή αυτού από το οποίο έγινε η αρχική ενεργοποίηση και για το οποίο έχουν προκύψει οι συγκεκριμένοι κλώνοι), οπότε πυροδοτείται η "δευτερογενής ανοσολογική αντίδραση" (Κοπτόπουλος 1993, Goldsby και συν. 2003). Στην εξέλιξή της, τα κύτταρα μνήμης παράγουν αντισώματα (κυρίως IgG και λιγότερο IgM) με μεγαλύτερη ταχύτητα και σε μεγαλύτερη ποσότητα, αντιδρώντας καλύτερα στη μόλυνση.

Ρόλος των Τ-λεμφοκυττάρων

Τα ανοσολογικά ανώριμα λεμφοκύτταρα μεταναστεύουν από το μυελό των οστών στο θύμο αδέν, όπου ωριμάζουν και αποκτούν μία ποικιλία υποδοχέων επιφάνειας. Τα ώριμα Τ-λεμφοκύτταρα μεταναστεύουν στο σπλήνα, στα λεμφογάγγλια και τις λεμφοειδείς δομές των

βλεννογόνων. Από εκεί, εισέρχονται στην αιματική κυκλοφορία προς ανεύρεση αντιγόνων (Cheville 1994, Goldsby και συν. 2003).

Για να ενεργοποιηθούν τα Τ-λεμφοκύτταρα πρέπει να έρθουν σε επαφή με το αντιγόνο. Η αναγνώριση κάποιου αντιγόνου από τα Τ-λεμφοκύτταρα είναι δυνατή, μόνον όταν αυτό συνδέεται με παράγοντες του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) της επιφάνειας των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (Brown και συν. 2002, Goldsby και συν. 2003). Σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση και ωρίμανση των Τ-λεμφοκυττάρων διαδραματίζει η ιντερλευκίνη-2 (Brown και συν. 2002, Goldsby και συν. 2003).

Τα ώριμα Τ-λεμφοκύτταρα ταξινομούνται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες ανάλογα με το είδος των υποδοχέων στην επιφάνειά τους: Τ-βοηθητικά, Τ-κυτταροτοξικά και Τ-κυτταροκατασταλτικά λεμφοκύτταρα.

Τ-βοηθητικά λεμφοκύτταρα ('CD4')

Τα Τ-βοηθητικά λεμφοκύτταρα (T-helper lymphocytes, T_h) παράγουν μία μεγάλη ποικιλία πεπτιδίων και πρωτεϊνών που λειτουργούν ως χημικοί διαβιβαστές. Οι ιντερλευκίνες ρυθμίζουν λειτουργίες, όπως η ενεργοποίηση των Β-λεμφοκυττάρων για την παραγωγή αντισωμάτων, η δράση των Τ-κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων και η ενεργοποίηση των μακροφάγων για την έναρξη της χρόνιας κοκκιωματώδους φλεγμονώδους αντίδρασης (καθυστερημένη αντίδραση υπερευαισθησίας) (Cheville 1994, Goldsby και συν. 2003). Τα Τ-βοηθητικά λεμφοκύτταρα χαρακτηρίζονται από την παρουσία του υποδοχέα CD4 (ιδιαίτερη αναφορά στους δείκτες επιφάνειας γίνεται παρακάτω), διακρίνονται δε περαιτέρω σε Τ-βοηθητικά 1 (T_{h1}), που προωθούν την κυτταρική ανοσία, και Τ-βοηθητικά 2 (T_{h2}), που προωθούν τη χυμική ανοσία. Η διαφοροποίηση των δύο τύπων Τ-βοηθητικών λεμφοκυττάρων εξαρτάται κυρίως από δύο παράγοντες: τον τύπο του αντιγόνου και το είδος των κυτοκινών που επηρεάζουν τη διαφοροποίησή τους (Brown και συν. 2002). Τα Τ-βοηθητικά λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν μόνον αντιγόνα συνδεδεμένα με τον παράγοντα MHC-II (Εικόνα Ι.1).

Τ-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα ('CD8')

Τα Τ-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα (T-cytotoxic cells, T_c) καταστρέφουν τα κύτταρα-"στόχους", δηλαδή κύτταρα προσβεβλημένα από τα αντιγόνα τα οποία έχουν προκαλέσει την ενεργοποίησή τους (Cheville 1994, Goldsby και συν. 2003). Χαρακτηρίζονται από την παρουσία του υποδοχέα CD8. Για να ενεργοποιηθούν, απαιτείται αλληλεπίδρασή τους με τα Τ-βοηθητικά λεμφοκύτταρα, ενώ για να εκφράσουν την κυτταροτοξική δράση τους, απαιτείται ο πολλαπλασιασμός τους. Τα Τ-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν μόνον αντιγόνα συνδεδεμένα με τον παράγοντα MHC-I (Εικόνα Ι.1).

T-κυτταροκατασταλτικά λεμφοκύτταρα ('CD8')

Ο ρόλος των T-κυτταροκατασταλτικών λεμφοκυττάρων (T-suppressor cells, T_s) δεν είναι απόλυτα γνωστός. Πιθανόν καταστέλλουν τους ανοσολογικούς μηχανισμούς μετά την απομάκρυνση του ερεθίσματος που τους ενεργοποίησε. Δεδομένου ότι χαρακτηρίζονται και αυτά από την παρουσία του υποδοχέα CD8, από κάποιους ερευνητές θεωρούνται ως τύπος των T-κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων.

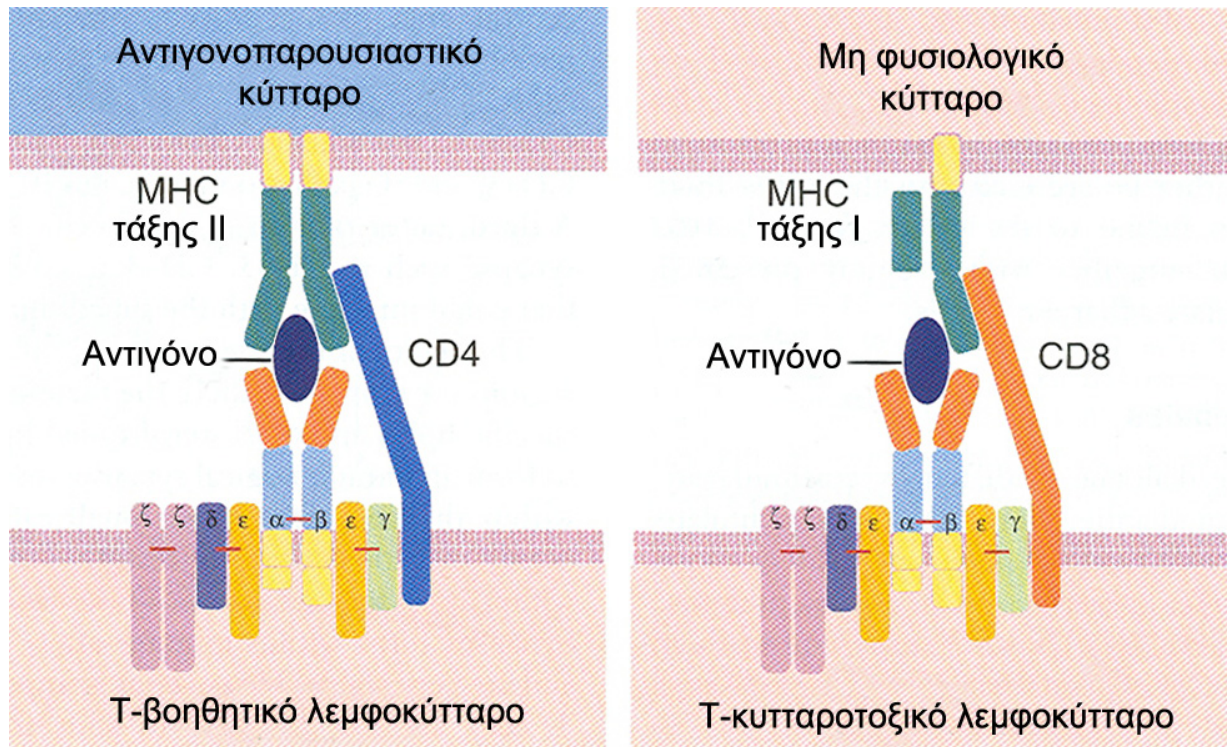
"Δείκτες επιφάνειας των λεμφοκυττάρων"

Στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης των λεμφοκυττάρων υπάρχουν υποδοχείς πρωτεϊνικής φύσης, οι οποίοι μεταβάλλονται ανάλογα με το στάδιο ωρίμανσης και τη λειτουργική δραστηριότητα των λεμφοκυττάρων. Η ονομασία που επικρατεί σήμερα για αυτούς είναι "δείκτες επιφάνειας λεμφοκυττάρων" (cell surface markers ή cell surface adhesion molecules), χωρίζονται δε σε τέσσερις κατηγορίες.

Δείκτες-υποδοχείς "cluster of differentiation" (CD)

Οι υποδοχείς CD ανιχνεύθηκαν με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων, είναι πρωτεϊνικής φύσεως και εμφανίζουν μία μεγάλη ποικιλία λειτουργιών. Τα B- και T-λεμφοκύτταρα εμφανίζουν διαφορετικούς υποδοχείς CD, ανάλογα με το στάδιο ωρίμανσης και ενεργοποίησής τους. Οι υποδοχείς αυτοί συνδέονται με παράγοντες του συμπληρώματος, αντισώματα, τρανσφερίνες και ιντερλευκίνες. Επιπλέον, μεταφέρουν το "μήνυμα" της σύνδεσης του αντιγόνου με τον αντίστοιχο υποδοχέα του T-λεμφοκυττάρου στο εσωτερικό του. Οι δείκτες-υποδοχείς CD εκφράζονται σε συγκεκριμένους πληθυσμούς λεμφοκυττάρων, οπότε με τη σήμανσή τους μπορεί να χαρακτηριστεί η πορεία και το στάδιο της φλεγμονής.

Εικόνα Ι.1. Ρόλος των ειδικών υποδοχέων επιφάνειας CD4 και CD8 στην ενεργοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων (Τ-βοηθητικά λεμφοκύτταρα και Τ-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα, αντίστοιχα). Οι υποδοχείς εξασφαλίζουν την αποτελεσματική σύνδεση του Τ-λεμφοκυττάρου με το αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο (MHC) και την επακόλουθη ενεργοποίησή του (Tizard 2004).



Ήδη από το 1987, οι Mackay, Maddox και Brandon (1987) πραγματοποίησαν αναγνώριση και χαρακτηρισμό των δεικτών-υποδοχέων CD στα πρόβατα, χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά αντισώματα. Έτσι, ανιχνεύθηκε ο δείκτης CD5 σε όλα τα Τ-λεμφοκύτταρα, ο δείκτης CD4 στα Τ-βοηθητικά λεμφοκύτταρα και ο δείκτης CD8 στα Τ-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα. Επίσης, οι παραπάνω ερευνητές επιβεβαίωσαν την αξιοπιστία των δεικτών MHC-II για τη διαπίστωση της ενεργοποίησης των Τ-λεμφοκυττάρων σε διαφορετικά σημεία του σώματος μετά από την ύπαρξη αντιγονικού ερεθίσματος, δεδομένου ότι οι συγκεκριμένοι δείκτες ανιχνεύονται σχεδόν σε όλα τα Β-λεμφοκύτταρα, στα ενεργοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα, καθώς και σε ορισμένα μακροφάγα και επιθηλιακά κύτταρα. Αργότερα, αναγνωρίστηκαν και άλλοι υποδοχείς στην επιφάνεια των λεμφοκυττάρων των προβάτων (Hein & Mackay 1991). Αναφέρεται η ανίχνευση του υποδοχέα CD2 στη μεμβράνη των $\alpha\beta$ TCR (CD4+, CD8+) Τ-λεμφοκυττάρων, ο οποίος όμως δεν ανιχνεύεται στα $\gamma\delta$ TCR (CD4-, CD8-) Τ-λεμφοκύτταρα. Επίσης, διαπιστώθηκε η παρουσία του υποδοχέα CD11a, ο οποίος λειτουργεί ως μόριο

προσκόλλησης των T-λεμφοκυττάρων, καθώς επίσης και των υποδοχέων CD44, CD45, CD58, CD59 και γδ, οι οποίοι βρίσκονται στην επιφάνεια των T19+ λεμφοκυττάρων.

Δείκτες για παράγοντες του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC)

Οι παράγοντες MHC είναι γλυκοπρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια ιστοσυμβατότητας και διακρίνονται σε δύο κύριες κατηγορίες. Οι παράγοντες MHC πρώτης τάξης (MHC-I) βρίσκονται στην επιφάνεια όλων των κυττάρων του σώματος, πλην των ερυθροκυττάρων. Οι παράγοντες MHC δεύτερης τάξης (MHC-II) βρίσκονται στην επιφάνεια των B-λεμφοκυττάρων, των ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων και των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων. Η κύρια λειτουργία των παραγόντων MHC είναι η παρουσίαση των αντιγόνων στα T-λεμφοκύτταρα. Διάφορα αντιγονικά πεπτίδια συνδέονται με τους παράγοντες αυτούς μέσα στο κύτταρο και στη συνέχεια, το σύμπλεγμα αντιγόνου-MHC εμφανίζεται στην επιφάνεια του κυττάρου, όπου αναγνωρίζεται από το T-λεμφοκύτταρο που φέρει τον κατάλληλο υποδοχέα (Brown και συν. 2002). Τα T-λεμφοκύτταρα μπορούν να αναγνωρίσουν το αντιγόνο μόνο εάν αυτό συνδέεται με το σύμπλεγμα πρωτεΐνης-MHC. Αντίθετα, τα B-λεμφοκύτταρα είναι ικανά να αναγνωρίσουν ελεύθερα ή συνδεδεμένα αντιγόνα (Goldsby και συν. 2003).

Υποδοχείς επιφάνειας στα B-λεμφοκύτταρα ή αντισώματα

Τα αντισώματα που είναι συνδεδεμένα με τη μεμβράνη των λεμφοκυττάρων είναι γλυκοπρωτεΐνες, των οποίων το μόριο αποτελείται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Η αναδιάταξη των γονιδίων που κωδικοποιούν την αλληλουχία των αμινοξέων σε κάθε μία από αυτές κατά την ωρίμανση των B-λεμφοκυττάρων, είναι υπεύθυνη για τη δημιουργία διαφορετικών πληθυσμών τους, ικανών να αναγνωρίζουν 10^{11} ή και περισσότερα διαφορετικά αντιγόνα (Brown και συν. 2002).

Το τμήμα του υποδοχέα που συνδέεται με το αντιγόνο είναι η πρωτεΐνη IgM. Ωστόσο, για την ενεργοποίηση του B-λεμφοκυττάρου απαιτείται και η αρωγή δύο επικουρικών πρωτεϊνών, των Igα και Igβ (Brown και συν. 2002).

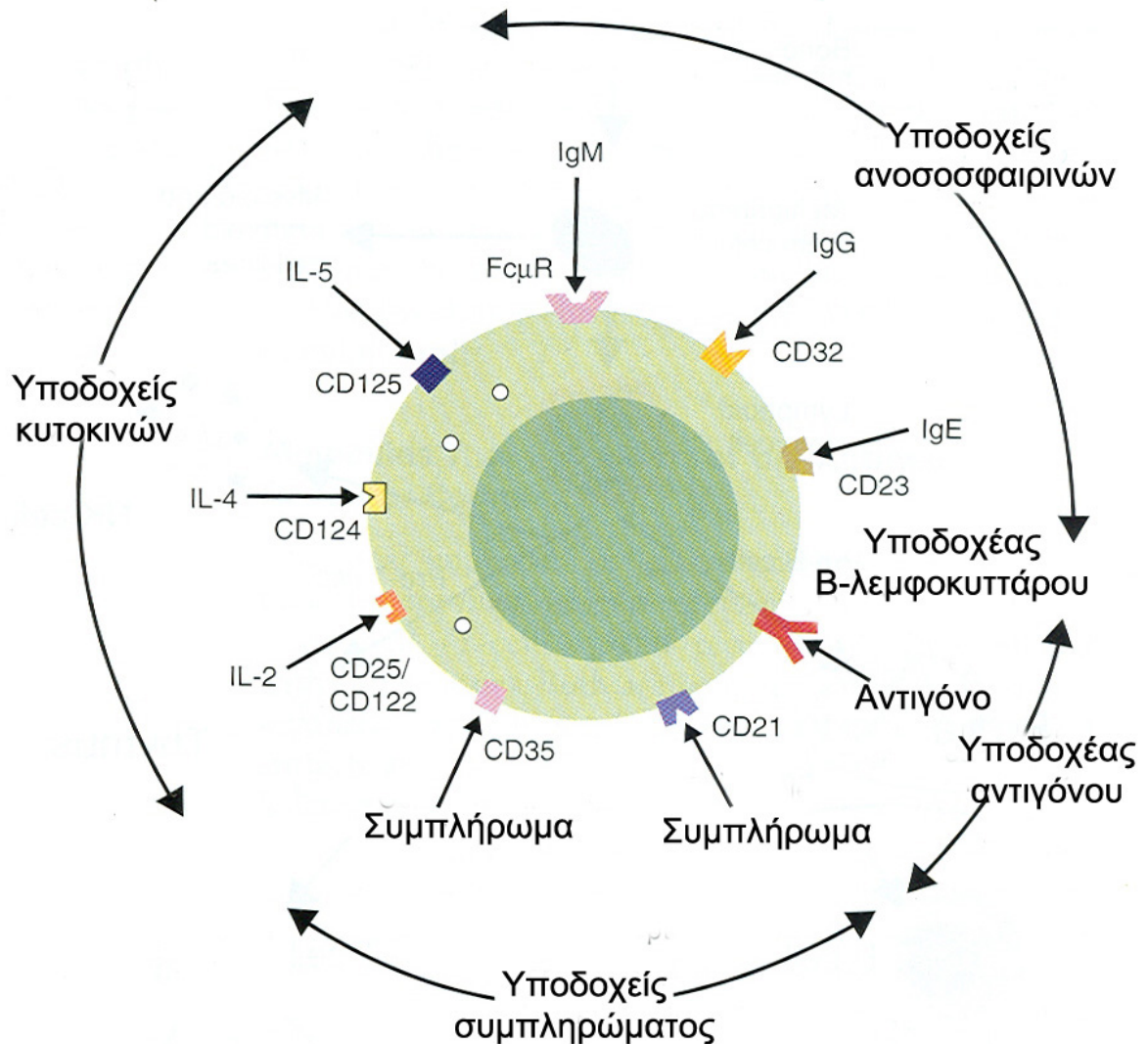
Στο μαστικό αδέν, έχουν ανιχνευθεί τέσσερις τύποι ανοσοσφαιρινών: οι IgG1, IgG2, IgA και IgM. Η συγκέντρωσή τους αυξάνεται σε περιπτώσεις μαστίτιδας, καθώς και κατά την παλινδρόμηση του μαστικού αδέν (Anderson, Smith, Shanks, Whitmore, Davis & Gustafsson 1986, Guidry & Miller 1986, Sordillo, Nickerson, Akers & Oliver 1987, Doymaz και συν. 1988, Norcross 1991). Οι ανοσοσφαιρίνες προέρχονται από τον ορό του αίματος (IgG1), παράγονται τοπικά από τα πλασμοκύτταρα στη θηλή ή στο μαστικό αδέν (IgA, IgM) ή προέρχονται και από τις δύο πηγές (IgG2) (Craven & Williams 1985, Norcross 1991). Σε περιπτώσεις φλεγμονής, οι IgG1 και IgG2 διαχέονται από τον ορό του αίματος στο μαστικό αδέν, καθώς αυξάνονται η διαπερατότητα των αγγείων και η είσοδος των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων (Anderson και

συν. 1986). Η IgG2 μεταφέρεται επίσης με τα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα, μέσω της προσκόλλησής της σε αυτά (Paape, Miller & Ziv 1991). Ο ρόλος των ανοσοσφαιρινών στο μαστικό αδένα αφορά στην αναστολή της προσκόλλησης των βακτηρίων στα μαστικά επιθηλιακά κύτταρα, στην εξουδετέρωση των βακτηριακών τοξινών, στην καταστροφή των βακτηριακών κυττάρων και στην υποβοήθηση της φαγοκυττάρωσης μέσω της οψωνοποίησης των βακτηρίων (Craven & Williams 1985, Guidry & Miller 1986, Norcross 1991). Σχηματική απεικόνιση των κυριότερων υποδοχέων επιφάνειας στα B-λεμφοκύτταρα παρουσιάζεται στην Εικόνα Ι.2.

Υποδοχείς επιφάνειας στα T-λεμφοκύτταρα

Οι υποδοχείς επιφάνειας στα T-λεμφοκύτταρα (*T-Cell Receptors, TCR*) δομικά μοιάζουν με τα αντισώματα της επιφάνειας των B-λεμφοκυττάρων, συνδέονται δε με πληθώρα αντιγόνων (π.χ. εισβάλλοντα βακτήρια). Ο υποδοχέας TCR αποτελείται από δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες, τις α και β ($\alpha\beta$ TCR). Κάθε μία από αυτές περιέχει μία σταθερή και μία μεταβλητή περιοχή. Η τελευταία καθορίζει και το σημείο αναγνώρισης, όπου συνδέεται το αντιγόνο. Οι υποδοχείς ενός μικρότερου πληθυσμού T-λεμφοκυττάρων αποτελούνται από τις αλυσίδες γ και δ ($\gamma\delta$ TCR), αντί για τις α και β . Τα $\gamma\delta$ -T-λεμφοκύτταρα αποτελούν έως και το 5% του συνολικού αριθμού των T-λεμφοκυττάρων, όμως αφθονούν στα επιθήλια. Η λειτουργία τους παραμένει ασαφής (Brown και συν. 2002) (Εικόνα Ι.3).

Εικόνα 1.2. Σχηματική απεικόνιση των κυριότερων υποδοχέων επιφάνειας στα Β-λεμφοκύτταρα, των συνδέσμων τους και της λειτουργίας τους (Tizard 2004).

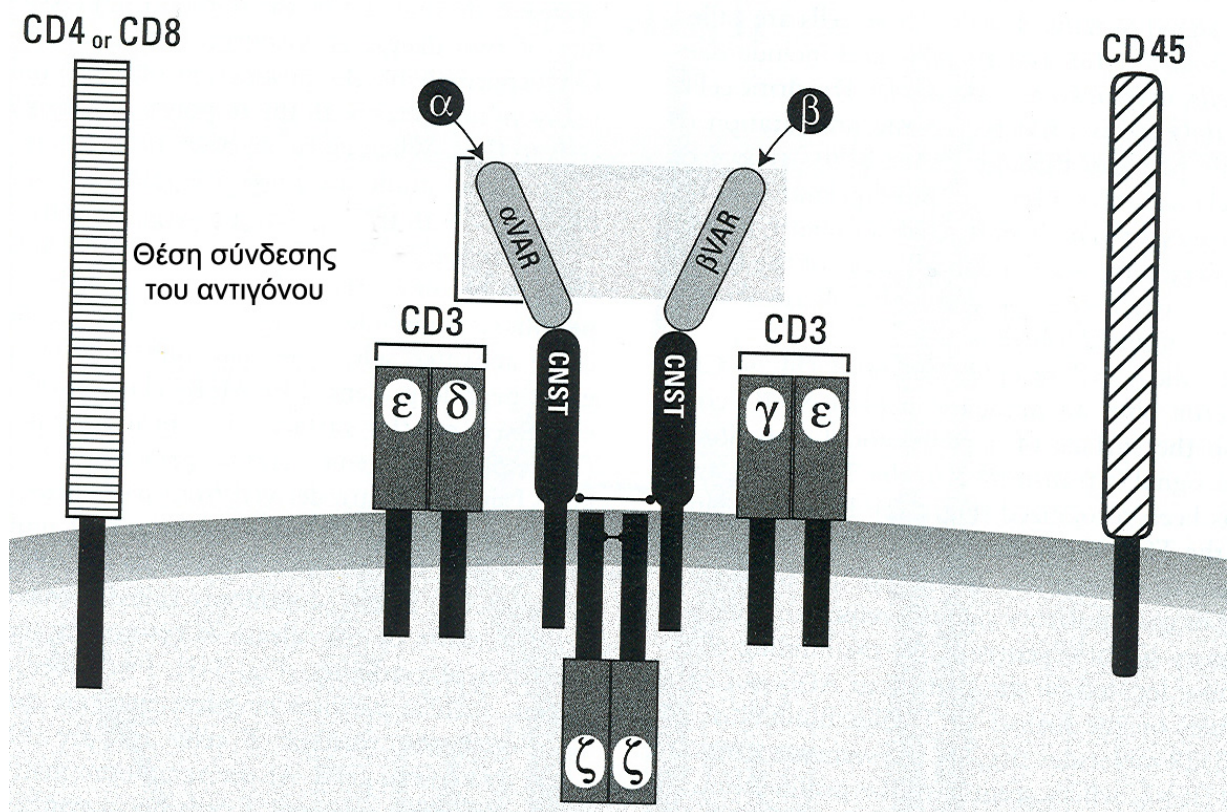


Το σύμπλεγμα των α και β πολυπεπτιδικών αλυσίδων του υποδοχέα TCR μπορεί να αναγνωρίζει μόνον αντιγόνα που συνδέονται με τους παράγοντες MHC-I και MHC-II των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (Goldsby και συν. 2003). Όλα τα ώριμα $\alpha\beta$ TCR T-λεμφοκύτταρα φέρουν επίσης έναν από τους CD4 ή CD8 υποδοχείς στην επιφάνειά τους (Cheville 1994). Οι υποδοχείς αυτοί συνεργάζονται με συστατικά του συμπλέγματος $\alpha\beta$ TCR κατά την αναγνώριση των αντιγόνων (Brown και συν. 2002). Η διακυτταρική μεταβίβαση του μηνύματος σύνδεσης του $\alpha\beta$ TCR υποδοχέα με το σύμπλεγμα αντιγόνου-MHC γίνεται από έναν τρίτο υποδοχέα (CD3) στην επιφάνεια του T-λεμφοκυττάρου, που βρίσκεται σε όλα τα T-

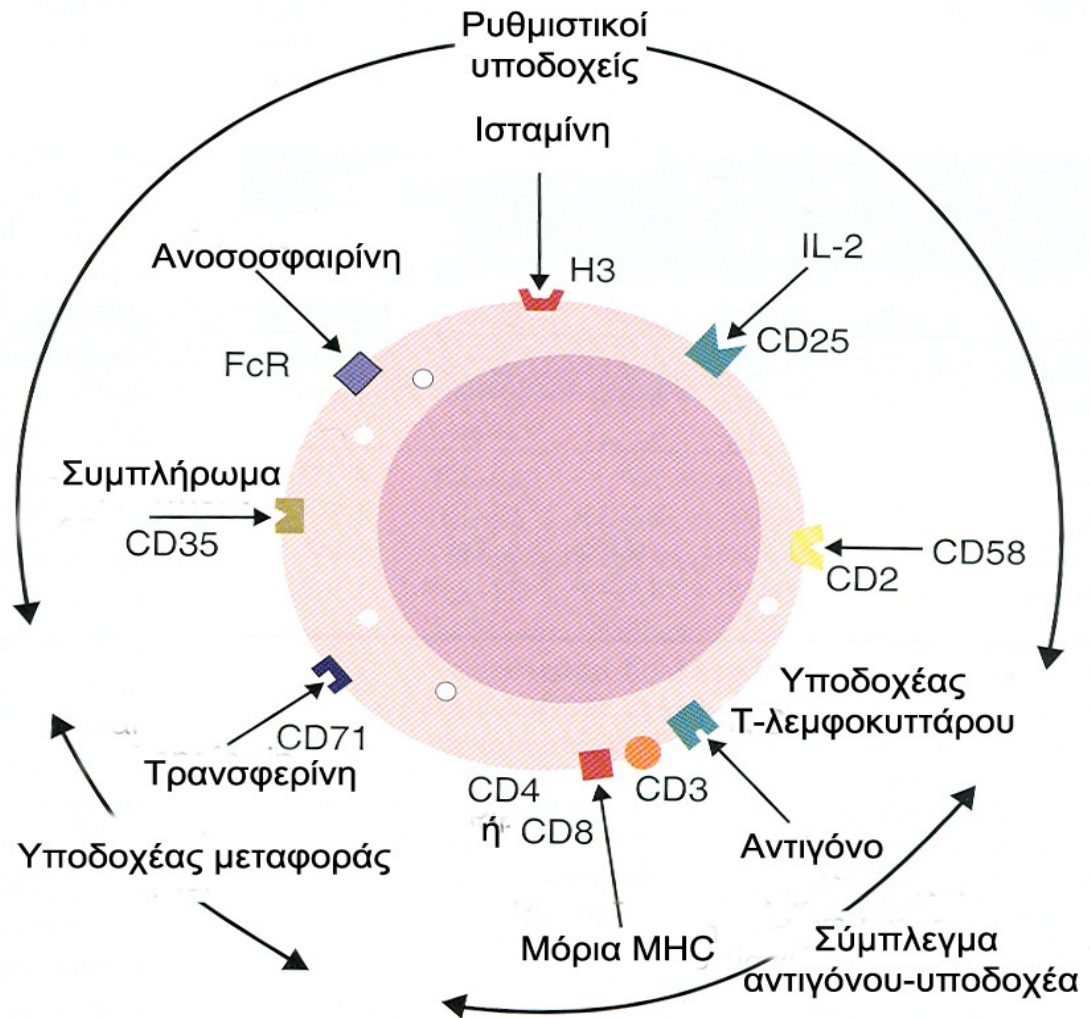
λεμφοκύτταρα (Cheville 1994). Τα T-λεμφοκύτταρα που φέρουν τον υποδοχέα CD4, αναγνωρίζουν αντιγόνα που συνδέονται με τον παράγοντα MHC-II στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, ενώ αυτά που φέρουν τον υποδοχέα CD8 αναγνωρίζουν αντιγόνα που συνδέονται με τον παράγοντα MHC-I στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (Cheville 1994, Brown και συν. 2002, Goldsby και συν. 2003). Σχηματική απεικόνιση των κυριότερων υποδοχέων στην επιφάνεια των B-λεμφοκυττάρων παρουσιάζεται στην Εικόνα Ι.4.

Στον Πίνακα Ι.ι παρατίθενται συνοπτικά οι δείκτες-υποδοχείς CD στα λεμφοκύτταρα, στο δε Πίνακα Ι.ii παρατίθεται συνοπτικά ο αμυντικός ρόλος των ανοσοσφαιρινών.

Εικόνα 1.3. Το σύμπλεγμα των υποδοχέων επιφάνειας στα Τ-λεμφοκύτταρα (*T-Cell Receptors, TCR*) αποτελείται από ένα ετεροδιμερές δύο πολυπεπτιδικών αλυσίδων (α - β), δύο ετεροδιμερή επικουρικών πολυπεπτιδικών αλυσίδων (γ - ϵ και δ - ϵ) και ένα ομοδιμερές δύο πολυπεπτιδικών αλυσίδων (ζ - ζ) ενδοκυτταροπλασματικά. Η μεταβαλλόμενη θέση των αλυσίδων α - β καθορίζει το σημείο σύνδεσης του λεμφοκυττάρου με το αντιγόνο. Μετά την αναγνώριση του αντιγόνου και τη σύνδεσή του με το χαρακτηριστικό υποδοχέα CD4 (Τ-βοηθητικά λεμφοκύτταρα) ή CD8 (Τ-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα), είναι απαραίτητη η σύνδεση του ενζύμου φωσφατάση της τυροσίνης (CD45) με το σύμπλεγμα των υποδοχέων επιφάνειας του λεμφοκυττάρου (Brown και συν. 2002).



Εικόνα 1.4. Σχηματική απεικόνιση των κυριότερων υποδοχέων επιφάνειας στα Τ-λεμφοκύτταρα, των συνδέσμων τους και της λειτουργίας τους (Tizard 2004).



Πίνακας I.i. Συνοπτική αναφορά των δεικτών-υποδοχέων CD στα λεμφοκύτταρα.

Λεμφοκύτταρο: στάδιο ανάπτυξης	Τ-λεμφοκύτταρα		Β-λεμφοκύτταρα	
	Δείκτης	Λειτουργία	Δείκτης	Λειτουργία
Ανώριμο	CD2	Υποδοχέας για LFA-2 και ερυθροκύτταρα προβάτου	IgM	Υποδοχέας αντιγόνου
	CD25	Υποδοχέας για ιντερλευκίνη 2	IgA, IgG, IgD	Υποδοχέας αντιγόνου που προκαλεί παραγωγή IgA ή IgG
	CD1, CD5	?	MHC-II	Παρουσίαση των αντιγονικών πεπτιδίων στα Τ-βοηθητικά λεμφοκύτταρα
	CD3	Μεταφορά μηνύματος σύνδεσης	MHC-I	Παρουσίαση των αντιγονικών πεπτιδίων στα Τ-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα
	TCR	Υποδοχέας αντιγόνου	CD19	Σήμανση των Β-λεμφοκυττάρων
	CD4	Σήμανση Τ-βοηθητικών λεμφοκυττάρων	CD20	Συμμετοχή στους διαύλους ιόντων Ca
	CD8	Σήμανση Τ-κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων	CD21	Υποδοχέας συμπληρώματος
Ωριμο	CD2, CD3, CD4, CD8	Όπως οι ανάλογοι δείκτες σε ανώριμα Τ-λεμφοκύτταρα	CD19, CD20, CD21	Όπως οι ανάλογοι δείκτες σε ανώριμα Β-λεμφοκύτταρα
	MHC-I	Παρουσίαση των αντιγονικών πεπτιδίων στα Τ-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα	MHC-I, MHC-II, IgM, IgA, IgG, IgD	Όπως οι ανάλογοι δείκτες σε ανώριμα Β-λεμφοκύτταρα
Ενεργοποιημένο	CD2, CD3, CD4, CD8, CD25	Όπως οι ανάλογοι δείκτες σε ανώριμα Τ-λεμφοκύτταρα	CD25	Υποδοχέας για ιντερλευκίνη-2
	MHC-I, MHC-II	Παρουσίαση των αντιγονικών πεπτιδίων στα Τ-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα	CD30	?
	CD54, CD58	Υποβοήθηση της προσκόλλησης του αντιγόνου		
Μνήμης	CD2, CD11a, CD54, CD58	Υποβοήθηση της προσκόλλησης του αντιγόνου	IgA, IgG, CD19	Όπως οι ανάλογοι δείκτες σε ανώριμα Β-λεμφοκύτταρα

Πίνακας I.ii. Συνοπτική αναφορά στον αμυντικό ρόλο των ανοσοσφαιρινών και των κυτοκινών στο μαστικό αδένα (Μαυρογιάννη & Φθενάκης 2004).

	Αμυντικός ρόλος
Ανοσοσφαιρίνες	
IgG ₁	Οψωνοποίηση βακτηρίων για υποβοήθηση της φαγοκυττάρωσης
IgG ₂	Οψωνοποίηση βακτηρίων για υποβοήθηση της φαγοκυττάρωσης
IgM	Παρεμπόδιση αποικιοποίησης από τα βακτήρια
IgA	Οψωνοποίηση βακτηρίων για υποβοήθηση της φαγοκυττάρωσης από τα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα, εξουδετέρωση βακτηριακών τοξινών
Κυτοκίνες	
IL-1	Ρύθμιση της μετανάστευσης ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων στο μαστικό αδένα, αύξηση του αριθμού τους, βελτίωση της φαγοκυτταρικής ικανότητάς τους
IL-2	Ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των μακροφάγων στο μαστικό αδένα, βελτίωση των αντιβακτηριακών ιδιοτήτων των λεμφοκυττάρων
IL-8	Πρόδρομη ουσία της φλεγμονής, ρύθμιση της μετανάστευσης ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων στο μαστικό αδένα
G-CSF	Αύξηση του αριθμού των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων στο μαστικό αδένα, βελτίωση των φαγοκυτταρικών ιδιοτήτων τους
GM-CSF	Βελτίωση των χημειοτακτικών και βακτηριοκτόνων ιδιοτήτων των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων, αύξηση του αριθμού των φαγοκυττάρων στο μαστικό αδένα
M-CSF	Ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των μακροφάγων
IFN-γ	Βελτίωση της φαγοκυττάρωσης από τα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα
TNF-α	Ενίσχυση της διαδικασίας φλεγμονής, βελτίωση της φαγοκυττάρωσης από τα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα

Λεμφοειδείς δομές των βλεννογόνων

Η παρουσία του λεμφικού ιστού είναι ουσιώδης για την ανοσοβιολογική άμυνα του οργανισμού. Εκτός από τον οργανωμένο λεμφικό ιστό (θύμος αδένας, σπλήνας, λεμφογάγγλια), λεμφικός ιστός υπάρχει διάσπαρτος σε διάφορα σημεία των βλεννογόνων του σώματος είτε διάχυτος, είτε με τη μορφή διακριτών, περιγεγραμμένων συναθροίσεων λευκοκυττάρων. Οι λεμφοειδείς δομές των βλεννογόνων (*Mucosa-associated-lymphoid-tissue*, MALT), είναι δευτερογενή λεμφικά όργανα. Σε αντίθεση με τις δευτερογενείς λεμφοειδείς δομές του σπλήνα και των λεμφογαγγλίων, οι οποίες παρέχουν προστασία κατά των αντιγόνων του αίματος και της λέμφου αντίστοιχα, οι λεμφοειδείς δομές των βλεννογόνων αποτελούν τα πρώτα σημεία άμυνας έναντι των εισβαλλόντων αντιγόνων (Lydyard & Rossi 2001).

Στα πρόβατα, λεμφοειδείς δομές έχουν ήδη περιγραφεί στις αμυγδαλές, στο ρινικό βλεννογόνο, στο βρογχικό επιθήλιο, στον εντερικό βλεννογόνο και στον επιπεφυκότα. Ένα κοινό χαρακτηριστικό τους, ανεξάρτητα από την ανατομική εντόπιση, είναι η παρουσία ενός ειδικού

τύπου επιθηλίου, το οποίο αποκαλείται "*follicle-associated-epithelium*" (McNeilly, McClure & Huntley 2008). Η Μαυρογιάννη (2006) ανέφερε επίσης την παρουσία συναθροίσεων λεμφοκυττάρων, οι οποίες εμφάνιζαν ομοιότητες με λεμφοειδείς δομές βλεννογόνων, στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου και τις χαρακτήρισε ως σημαντικό αμυντικό μηχανισμό της θηλής του μαστού. Μολοταύτα, τα χαρακτηριστικά τους δεν έχουν διαλευκανθεί.

Οι λεμφοειδείς δομές των βλεννογόνων λειτουργούν με τρόπο ανάλογο των λεμφοζιδίων: αναγνωρίζουν το εισβάλλον αντιγόνο και κινητοποιούν κυτταρικές και χυμικές ανοσολογικές αντιδράσεις, όπου απαιτείται. Σε αυτές οι ζώνες κατανομής B- και T-λεμφοκυττάρων, καθώς και των βοηθητικών κυττάρων της φλεγμονής (π.χ. μακροφάγων, δένδριτικών κυττάρων) είναι καλά διακριτές. Οι λεμφοειδείς δομές σχηματίζονται μεν κατά την εμβρυϊκή ζωή, αλλά δεν ενεργοποιούνται έως την έκθεσή τους σε κάποιο αντιγόνο.

Ο ρόλος των κυτοκινών

Οι κυτοκίνες είναι μία ομάδα ρυθμιστικών πρωτεϊνών, που δρουν ως ενδοκυτταρικά επικοινωνιακά σήματα, εκκρίνονται σε μικρές ποσότητες και έχουν πολλαπλές βιολογικές δραστηριότητες (Schijns & Horzinek 1997). Η διαδοχική ενεργοποίηση των διαφόρων κυτοκινών είναι σημαντική για την εξέλιξη της φλεγμονώδους αντίδρασης (Chensue, Terebuh, Remick, Scales & Kunkel 1991). Ο χρόνος εμφάνισης και η ποσότητα των κυτοκινών ποικίλουν ανάλογα με το είδος του αντιγόνου.

Η ιντερλευκίνη-1 (IL-1) και ο παράγοντας TNF-α παράγονται από πολλούς τύπους κυττάρων, κυρίως δε από τα μακροφάγα. Η δράση τους συνίσταται στην ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων, των ενδοθηλιακών κυττάρων και των μακροφάγων. Η παραγωγή ιντερλευκίνης-1 και παράγοντα TNF-α από τα μακροφάγα στοχεύει στην ενίσχυση της λειτουργίας των ιδίων των μακροφάγων κατά τη διάρκεια της φλεγμονής. Επιπρόσθετα, βασική λειτουργία του παράγοντα TNF-α είναι η πρόκληση της σύνθεσης και της έκλυσης των πρωτεϊνών οξείας φάσης, οι οποίες προωθούν περαιτέρω τη διαδικασία της φλεγμονής. Ο συνδυασμός της δράσης των δύο αυτών κυτοκινών είναι μεγάλης σημασίας για την εξέλιξη της φλεγμονής, καθώς έτσι ενεργοποιούνται τα T-λεμφοκύτταρα, τα οποία, στη συνέχεια, εκκρίνουν άλλες κυτοκίνες (ιντερλευκίνη-2, ιντερφερόνη-γ), που ενεργοποιούν τα B-λεμφοκύτταρα (Hamblin 1993, Cheville 1994).

Σημαντική δράση έχει και η ιντερλευκίνη-6 (IL-6), μία πλειοτροπική κυτοκίνη, η οποία, ενεργοποιώντας την παραγωγή πρωτεϊνών οξείας φάσης, προκαλεί τη διαφοροποίηση των B-

λεμφοκυττάρων, υποβοηθά την ωρίμανση των πλασμοκυττάρων και προκαλεί τον πολλαπλασιασμό των T-κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων. Παρόμοια είναι και η δράση της ιντερλευκίνης-8 (IL-8) (Cheville 1994).

Τέλος, στην κατηγορία των κυτοκινών ανήκουν και οι ιντερφερόνες. Οι ιντερφερόνες συντίθενται και εκκρίνονται από κύτταρα προσβεβλημένα από ιούς ή μικρόβια. Η δράση τους στην ενεργοποίηση των μονοκυττάρων συνίσταται στην αύξηση της δυνατότητας έκφρασης των υποδοχέων Fc και MHC-II (Hamblin 1993, Cheville 1994).

Είναι γνωστό ότι, *in vivo*, η ιντερλευκίνη-1β και ο παράγοντας TNF-α προκαλούν συνάθροιση λευκοκυττάρων στο μαστικό αδένα και στη θηλή του μαστού της αγελάδας (Daley, Williams, Dougherty, Furda, Hayes & Coyle 1993, Mulder & Colditz 1993, Persson, Larsson & Sandgren 1993). Επίσης, προκαλούν την παραγωγή παραγόντων CSF από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα μακροφάγα (Cannistra & Griffin 1988), καθώς και ιντερλευκίνης-8 (Baggiolini, Mauderli, Näf & Catanese 1985, Delannoy, Lekeux & Miossec 1993). Ωστόσο, *in vivo*, η ιντερλευκίνη-8 δεν προκαλεί τη συνάθροιση λευκοκυττάρων στη θηλή του μαστού της αγελάδας (Persson και συν. 1993).

Οι Persson, Colditz, Flapper, Franklin και Seow (1996) μελέτησαν την προκαλούμενη από την ιντερλευκίνη-1β, τον παράγοντα TNF-α, την ιντερλευκίνη-8 και τον παράγοντα GM-CSF φλεγμονώδη αντίδραση στο θηλαίο κόλπο και στο παρέγχυμα του μαστικού αδένα προβατίνων και κατέληξαν στα παρακάτω συμπεράσματα: (α) στο μαστικό παρέγχυμα η κυτταρική αντίδραση εξαρτάτο από τη δόση της σχετικής κυτοκίνης, ενώ στο θηλαίο κόλπο όχι και (β) ο πιο σημαντικός ενεργοποιητής της φλεγμονής ήταν η ιντερλευκίνη-1β, ακολουθούμενη από τον παράγοντα TNF-α, την ιντερλευκίνη-8 και τον παράγοντα GM-CSF. Μάλιστα, οι δύο τελευταίοι παράγοντες δεν προκάλεσαν καμία κυτταρική αντίδραση στο μαστικό παρέγχυμα. Επιπλέον, οι συγγραφείς απέδωσαν τις διαφορές στην ανταπόκριση μεταξύ θηλαίου κόλπου και μαστικού παρεγχύματος σε παράγοντες, όπως ο ρυθμός αιματικής ροής, η ύπαρξη διαφορετικού αριθμού και είδους υποδοχέων κυτοκινών και η ύπαρξη ή απουσία γάλακτος σε καθέναν από τους δύο ιστούς.

Στον Πίνακα I.ii παρατίθεται συνοπτικά ο αμυντικός ρόλος των κυτοκινών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ II

ΔΙΕΙΣΔΥΣΗ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ *MANNHEIMIA* *HAEMOLYTICA* ΣΤΗ ΘΗΛΗ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΤΩΝ ΠΡΟΒΑΤΩΝ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σε προηγούμενες μελέτες αποδείχθηκε ότι η εναπόθεση *Mannheimia haemolytica* στο θηλαίο πόρο σε θηλές του μαστού, στις οποίες υπήρχαν αλλοιώσεις, κατέληξε στην εκδήλωση κλινικής μαστίτιδας. Αντίθετα, όπως ήδη αναφέρθηκε, η υγιής θηλή του μαστού παίζει σημαντικό προστατευτικό ρόλο έναντι των μικροοργανισμών. Αυτή η διαφορά αποδόθηκε στην ανεπάρκεια των αμυντικών μηχανισμών της θηλής του μαστού.

Ο πιθανός ρόλος των αλλοιώσεων της θηλής του μαστού στη διείσδυση βακτηρίων εντός αυτής δεν έχει αξιολογηθεί. Σκοπός της μελέτης αυτής ήταν η διερεύνηση του πιθανού ρόλου των αλλοιώσεων της θηλής του μαστού στη διείσδυση των βακτηρίων εντός αυτής και στην επακόλουθη άνοδό τους προς το μαστικό παρέγχυμα.

B. ΔΙΕΙΣΔΥΣΗ *MANNHEIMIA HAEMOLYTICA* ΣΤΗ ΘΗΛΗ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΤΩΝ ΠΡΟΒΑΤΩΝ

Υλικά και μέθοδοι

Πειραματικός σχεδιασμός

Πραγματοποιήθηκαν δύο πειραματισμοί μετά από εξασφάλιση σχετικής άδειας από τη Διεύθυνση Κτηνιατρικής της Νομαρχιακής Αυτοδιοίκησης Καρδίτσας. Σε αυτούς χρησιμοποιήθηκαν 20 πρωτοτόκες προβατίνες Καραγκούνικης φυλής, κατά τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου τους. Τα ζώα προέρχονταν από εκτροφή της περιοχής Καρδίτσας. Κατά τη διάρκεια του πειραματισμού, τα ζώα σταβλίστηκαν στις εγκαταστάσεις της Κλινικής. Στα ζώα χορηγούνταν δύο φορές την ημέρα 750 g έτοιμης συμπυκνωμένης ζωοτροφής σε μορφή συμπύκτων (Ζωοτεχνική Καρδίτσας, Καρδίτσα) και άριστης ποιότητας σανός.

Πριν την έναρξη του πειραματισμού, σε κάθε ζώο πραγματοποιήθηκε αποπαρασιτισμός με υποδόρια χορήγηση ενέσιμου διαλύματος μοξιδεκτίνης 1% (Cydectin®-Fort Dodge Animal Health Inc., Overland Park, ΗΠΑ) σε δόση 0,2 mg ανά kg σωματικού βάρους. Σε κανένα από τα πειραματόζωα δε χορηγήθηκαν αντιμικροβιακοί παράγοντες κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και της γαλακτικής περιόδου.

*1ος πειραματισμός: εναπόθεση *M. haemolytica* στο στόμιο θηλών με αλλοιώσεις και στη συνέχεια άρμεξη των ζώων*

Στον πειραματισμό χρησιμοποιήθηκαν 12 πρωτοτόκες προβατίνες. Τα αρνιά τους απογαλακτίστηκαν τη 18η ημέρα μετά τον τοκετό. Στη συνέχεια, τα πειραματόζωα αρμέγονταν, πάντοτε από το ίδιο άτομο, τρεις φορές καθημερινά. Η διαδικασία πρόκλησης αλλοιώσεων στις θηλές του μαστού άρχισε τέσσερις ημέρες αργότερα (22η ημέρα της γαλακτικής περιόδου).

Συγκεκριμένα, οι προβατίνες συγκρατήθηκαν σε όρθια θέση και οι μαστικοί αδένες κενώθηκαν με άρμεξη. Μετά από 30 min, το δέρμα γύρω από το στόμιο της αριστερής θηλής του μαστού ήρθε σε επαφή επί 60 sec με την επιφάνεια διαλύματος καυστικού νατρίου, κανονικότητας 1 N (ημέρα D-2). Η διαδικασία επαναλήφθηκε την επόμενη ημέρα (ημέρα D-1). Η βαρύτητα των δερματικών αλλοιώσεων βαθμολογήθηκε σύμφωνα με την κλίμακα κατάταξης αλλοιώσεων θηλών, που έχει περιγραφεί από τους Fox, Nagy, Hillers, Cronrath και Ratkowsky

(1991) (Πίνακας II.i). Οι αλλοιώσεις περιορίζονταν στην περιοχή επαφής της θηλής του μαστού με το καυστικό νάτριο, δηλαδή στο δέρμα γύρω από το στόμιο της θηλής. Στη δεξιά θηλή του μαστού των ζώων δεν έγινε καμία παρέμβαση.

Πίνακας II.i. Κλίμακα κατάταξης των αλλοιώσεων στις θηλές του μαστού προβατίνων μετά από την εμβάπτιση του άκρου τους σε διάλυμα καυστικού νατρίου (Fox και συν. 1991).

Βαθμίδα των αλλοιώσεων	Περιγραφή των αλλοιώσεων
1	Κλινικά υγιής θηλή, χωρίς παθολογικά ευρήματα
2	Αλλοιώσεις μικρής βαρύτητας, σε έκταση μικρότερη του 50% της επιφάνειας της θηλής: σχισμές, ραγάδες και εφελκίδες στα σημεία εξέλκωσης - απουσία αντίδρασης του ζώου κατά την ψηλάφηση
3	Αλλοιώσεις σε έκταση 50% έως 75% της επιφάνειας της θηλής: σχισμές, ραγάδες και εξελκώσεις - μέτρια αντίδραση του ζώου κατά την ψηλάφηση
4	Αλλοιώσεις σε έκταση μεγαλύτερη του 75% της επιφάνειας της θηλής: σοβαρές ελκωτικές αλλοιώσεις - έντονη ευαισθησία της θηλής κατά την ψηλάφηση

Στη συνέχεια, τα ζώα χωρίστηκαν σε δύο ομάδες (Α και Β, n=6). Στην κάτω επιφάνεια της θηλής του μαστού τους επαλείφτηκε, όπως περιγράφεται παρακάτω, ζωμός που περιείχε καλλιέργεια *M. haemolytica*.

Στα ζώα της ομάδας Α έγινε επάλειψη (ημέρα D0) ζωμού με το στέλεχος VSM08L. Αυτό είχε απομονωθεί στην Ελλάδα σε δύο συνεχόμενες δειγματοληψίες από υλικό από το θηλαίο πόρο μίας κλινικά υγιούς προβατίνας. Το στέλεχος είχε προκαλέσει κλινική μαστίτιδα μετά από ενοφθαλμισμό στο γαλακτοφόρο κόλπο προβατίνων και υποκλινική μαστίτιδα μετά ενοφθαλμισμό στο θηλαίο πόρο των ζώων (Μαυρογιάννη 2006, Μανρογιάννη, Cripps & Fthenakis 2007).

Στα ζώα της ομάδας Β έγινε επάλειψη (ημέρα D0) ζωμού με το στέλεχος DAG21R. Αυτό είχε απομονωθεί στην Ελλάδα από την ανώτερη αναπνευστική οδό ενός κλινικά υγιούς αρνιού.

Σε όλα τα ζώα, έγινε επάλειψη και στις δύο θηλές του μαστού. Συνοπτικά, η πρόκληση αλλοιώσεων (**A**) ή/και η πραγματοποίηση πειραματικής μόλυνσης (**M**) στις θηλές των ζώων ήταν ως εξής:

ομάδα Α: αριστερή θηλή **A+/M+** (στέλεχος VSM08L),
δεξιά θηλή **A-/M+** (στέλεχος VSM08L),
ομάδα Β: αριστερή θηλή **A+/M+** (στέλεχος DAG21R),
δεξιά θηλή **A-/M+** (DAG21R).

2ος πειραματισμός: εναπόθεση *M. haemolytica* στο στόμιο θηλών με αλλοιώσεις και στη συνέχεια φυσικός θηλασμός τους

Στον πειραματισμό χρησιμοποιήθηκαν οκτώ πρωτοτόκες προβατίνες (ομάδα Γ), με δύο αρνιά καθεμιά. Την 22η ημέρα της γαλακτικής περιόδου και, ενώ η γαλουχία των αρνιών συνεχιζόταν, άρχισε η διαδικασία πρόκλησης αλλοιώσεων στην αριστερή θηλή του μαστού (D-1). Η διαδικασία επαναλήφθηκε την επομένη ημέρα (D0). Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας πρόκλησης αλλοιώσεων, τα αρνιά των πειραματόζων απομακρύνονταν για χρονικό διάστημα 2 h. Στα ζώα δεν έγινε άλλη παρέμβαση ή ενοφθαλμισμός. Συνοπτικά, η πρόκληση αλλοιώσεων (**A**) και η πειραματική μόλυνση (**M**) στις θηλές του μαστού των ζώων ήταν ως εξής:

όλα τα ζώα: αριστερή θηλή του μαστού **A+/M-**,
δεξιά θηλή του μαστού **A-/M-**.

Ο όλος πειραματικός σχεδιασμός παρουσιάζεται συνοπτικά στον Πίνακα II.ii.

Πίνακας II.ii. Περιληπτική παρουσίαση του πειραματικού σχεδιασμού για αξιολόγηση της διείσδυσης *M. haemolytica* στη θηλή του μαστού προβατίνων.

Ομάδα - Αλλοιώσεις στις θηλές	Παρουσία αρνιών	Πειραματική μόλυνση
1ος πειραματισμός		
Ομάδα Α (n=6): Αριστερή θηλή: A+ Δεξιά θηλή: A-	Όχι	Στέλεχος VSM08L Αριστερή θηλή: M+ Δεξιά θηλή: M+
Ομάδα Β (n=6): Αριστερή θηλή: A+ Δεξιά θηλή: A-	Όχι	Στέλεχος DAG21R Αριστερή θηλή: M+ Δεξιά θηλή: M+
2ος πειραματισμός		
Ομάδα Γ (n=8): Αριστερή θηλή: A+ Δεξιά θηλή: A-	Ναι (δύο κάθε ζώο)	Αριστερή θηλή: M- Δεξιά θηλή: M-

A: πρόκληση αλλοιώσεων, **M:** επάλειψη ζωμού με καλλιέργεια *M. haemolytica*.

Προετοιμασία του ενοφθαλμίσματος και τεχνική ενοφθαλμισμού

Για να επιτευχθούν άσηπτες, κατά το δυνατόν, συνθήκες έγινε προετοιμασία των θηλών του μαστού πριν τον ενοφθαλμισμό. Αυτή περιελάμβανε απομάκρυνση των τριχών, καθαρισμό του δέρματος και της κάτω περιοχής του μαστού με αντισηπτικό διάλυμα και πλύση με αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό.

Κάθε βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε για ενοφθαλμισμό, καλλιεργήθηκε σε τρυβλίο με αιματούχο (5% πρόβειο αίμα) άγαρ Columbia. Στη συνέχεια, δύο αποικίες από το

τρυβλίο ενοφθαλμίστηκαν σε φιαλίδιο με 9 mL ζυμού Soy (BioMerieux S.A., Marcy-l'Etoile, Γαλλία), το οποίο επωάστηκε σε αερόβιο περιβάλλον σε θερμοκρασία 37 °C επί 5 ώρες.

Ο ενοφθαλμισμός έγινε την ημέρα D0. Οι προβατίνες συγκρατήθηκαν σε όρθια θέση και αρμέχτηκαν, ώστε να κενωθεί τελείως ο μαστικός αδένας τους. Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας ένα βαμβακοφόρο στειλεό (Sterilin Ltd, Stone, Ηνωμένο Βασίλειο), που είχε προηγουμένως εμβαπτιστεί στο ζυμό με την καλλιέργεια των βακτηρίων, έγινε επάλειψη του δέρματος γύρω από το στόμιο της θηλής του μαστού για χρονικό διάστημα 5 έως 7 sec.

Εξετάσεις πριν και μετά τον ενοφθαλμισμό

Κλινική εξέταση

Αμέσως μετά τον τοκετό και στη συνέχεια, κάθε δύο ημέρες, έως και την ημέρα D0, πραγματοποιούνταν γενική κλινική εξέταση των ζώων, καθώς και κλινική εξέταση των μαστικών αδένων και των θηλών τους. Μετά την πειραματική μόλυνση (D0), γίνονταν καθημερινά έως την ημέρα D7 και στη συνέχεια την D11, την D15 και την D20 (1ος πειραματισμός) ή κάθε δύο ημέρες έως την ημέρα D20 (2ος πειραματισμός) κλινική εξέταση των ζώων. Τις ίδιες ημέρες πραγματοποιούνταν επίσης δειγματοληψίες.

Μετά τη γενική κλινική εξέταση του ζώου, ακολουθούσε κλινική εξέταση του μαστού. Γινόταν συγκράτηση του ζώου σε τέτοια θέση, ώστε η περινεϊκή χώρα ακουμπούσε στο δάπεδο και η ράχη του στηριζόταν στα πόδια ενός βοηθού. Οι δύο μαστικοί αδένες παρατηρούνταν, ψηλαφούνταν και συγκρίνονταν μεταξύ τους. Το σχήμα τους, το μέγεθός τους, η θερμοκρασία τους και οποιοσδήποτε ανωμαλίες τους καταγράφονταν. Ακολουθούσε, ψηλάφηση των επιχώριων λεμφοαγγλίων.

Οι δύο θηλές του μαστού παρατηρούνταν, ψηλαφούνταν και συγκρίνονταν μεταξύ τους. Το μέγεθός τους, η θερμοκρασία τους, η υφή του τοιχώματός τους και οποιοσδήποτε ανωμαλίες καταγράφονταν.

Δειγματοληψίες

Στον 1ο πειραματισμό, αρχικά γινόταν δειγματοληψία από το δέρμα στην κάτω επιφάνεια της θηλής του μαστού, χρησιμοποιώντας αποστειρωμένο βαμβακοφόρο στειλεό. Το άκρο του στειλεού είχε εμποτιστεί με στείρο ζυμό Soy.

Στη συνέχεια, λαμβάνονταν (1ος και 2ος πειραματισμός) δείγματα υλικού θηλαίου πόρου με τη βοήθεια στείρου, λεπτού, πλαστικού καθετήρα, όπως περιγράφηκε και αξιολογήθηκε από τους Μαυρογιάννη (2006) και τους Mavrogianni, Cripps και Fthenakis (2006). Συνοπτικά, η

τεχνική συνίσταται στη χρησιμοποίηση στείρου, λεπτού, πλαστικού καθετήρα 20 G (Abbocath® - Abbott Laboratories Inc., Abbott Park, ΗΠΑ), από τον οποίο αφαιρείται ο μεταλλικός οδηγός - βελόνα. Στη συνέχεια, ο καθετήρας κόβεται σε μήκος 2 mm με στείρα λεπίδα χειρουργικού νυστεριού. Μετά από απολύμανση του στομίου και του κατώτερου τμήματος (1 cm) της θηλής του μαστού με διάλυμα ιωδιούχου ποβιδόνης και πλύση τους με αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό, ο καθετήρας εισάγεται στο θηλαίο πόρο, στο εσωτερικό τοίχωμα του οποίου περιστρέφεται.

Ακολουθούσε η συλλογή δειγμάτων γάλακτος. Οι δύο πρώτες ριπές γάλακτος συλλέγονταν σε πλαστικό δίσκο και εξετάζονταν για την ύπαρξη παθολογικών χαρακτηριστικών. Ακολουθούσε η λήψη δείγματος σε στείρο φιαλίδιο (Sterilin Ltd, Stone, Ηνωμένο Βασίλειο) για εργαστηριακή εξέτασή του.

Σε κάθε περίπτωση λαμβάνονταν δείγματα και από τα δύο ημιμόρια του μαστού κάθε ζώου (κάθε ημιμόριο αποτελείται από τη θηλή και το σύστοιχο μαστικό αδένα).

Στο 2ο πειραματισμό, από την ημέρα D-1 και κάθε εβδομάδα (ημέρες D6, D13, D20) λαμβάνονταν επιπλέον δείγματα από την ανώτερη αναπνευστική οδό των αρνιών, χρησιμοποιώντας την τεχνική που περιγράφηκε από τους Al-Sultan και Aitken (1985). Συνοπτικά, η τεχνική συνίσταται στην εισαγωγή ενός βαμβακοφόρου στειλεού στη στοματική κοιλότητα των αρνιών, ώστε να έρθει σε επαφή με τις αμυγδαλές των ζώων.

Κυτταρολογική εξέταση

Σε κάθε δείγμα γάλακτος πραγματοποιήθηκε η δοκιμή California Mastitis Test (CMT) (αντιδραστήριο Jorgen Kruuse A/S, Marslev, Δανία). Η δοκιμή συνίσταται στην ανάμιξη περίπου 2 mL γάλακτος με ίση ποσότητα αντιδραστηρίου (3% λαουρυλοθειικό νάτριο) σε κύπελλο (διάμετρος 7,5 cm, βάθος 2 cm) ειδικής συσκευής, μετά από τοποθέτησή της κάτω από τις θηλές του μαστού του ζώου, άμεση πρόσθεση του αντιδραστηρίου και ανάμιξή τους με κυκλικές κινήσεις της συσκευής. Η αντίδραση βαθμολογείται ως εξής: "αρνητικό", "ίχνη", "1", "2", "3", σύμφωνα με το πρότυπο που περιγράφεται στον Πίνακα II.iii. Βαθμολόγηση της αντίδρασης με τουλάχιστον "1" ("θετική αντίδραση") θεωρείται ενδεικτική αυξημένου αριθμού σωματικών κυττάρων στο γάλα (Fthenakis 1995). Επιπλέον, παρασκευάζονταν επιχρίσματα από το δείγμα γάλακτος για χρώση Giemsa (Merck KGaA, Darmstadt, Γερμανία).

Πίνακας II.iii. Πρότυπο βαθμολογίας των αντιδράσεων στη δοκιμή CMT στο γάλα προβατίνων (Fthenakis 1995).

Βαθμολογία	Περιγραφή της αντίδρασης
Αρνητική	Απουσία αντίδρασης ή παρουσία μικρής αρχικής κοκκίωσης που διαλύεται γρήγορα
Ίχνη	Παρουσία μικρής κολλώδους μάζας, πιο ευκρινούς στο άκρο του κυπέλλου
1	Παρουσία μεγάλης κολλώδους μάζας, που δε συγκεντρώνεται κατά την ανακίνηση του μίγματος
2	Παρουσία μεγάλης κολλώδους μάζας ή ημιστερεού πηγματος, που συγκεντρώνεται στο κέντρο ή μετακινείται προς το άκρο, κατά την ανακίνηση του μίγματος
3	Παρουσία στερεού και κολλώδους πηγματος, που σχηματίζει ομοιογενή μάζα προσκολλημένη στο βυθό του κυπέλλου

Παθολογοανατομική εξέταση

Σε όλα τα ζώα στον 1ο πειραματισμό, έγινε ευθανασία κάτω από γενική αναισθησία την ημέρα D20. Σε κάθε ζώο πραγματοποιήθηκε νεκροτομή και, εφαρμόζοντας συνθήκες άσηπτης δειγματοληψίας, ελήφθησαν δείγματα ιστών για βακτηριολογική εξέταση. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε και σε ένα ζώο, που πέθανε, κατά τη διάρκεια του 2ου πειραματισμού.

Μετά, αφαιρέθηκε ο μαστός και έγινε λεπτομερής εξέτασή του. Αρχικά, οι μαστικοί αδένες και οι θηλές εξετάστηκαν με επισκόπηση και ψηλαφήθηκαν σε όλη την έκτασή τους. Στη συνέχεια, έγινε θηλεκτομή στη βάση κάθε θηλής.

Μετά την αποκοπή των δύο θηλών, έγιναν πολλαπλές εγκάρσιες διατομές πάχους 10 έως 12 mm στους δύο μαστικούς αδένες. Τα τεμάχια ελέγχθηκαν σε όλη την έκταση και το πάχος τους, ώστε να εντοπιστούν τυχόν αλλοιώσεις. Τέλος, ελήφθησαν υπό άσηπτες συνθήκες (μετά από επαφή πυρακτωμένης μεταλλικής σπάτουλας και τομή με λεπίδα στείρου χειρουργικού νυστεριού) δείγματα ιστού από το μαστικό παρέγχυμα για βακτηριολογική εξέταση. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε για τη λήψη δείγματος από τα επιχώρια λεμφογάγγλια.

Κάθε θηλή συγκρατήθηκε με μικρού μεγέθους πινέζες σε πίνακα από φελλό και, αφού αποστειρώθηκε η επιφάνειά της με επαφή πυρακτωμένης μεταλλικής σπάτουλας, το δέρμα της διανοίχθηκε με στείρα χειρουργική λεπίδα κατά μήκος. Έτσι, αποκαλύφθηκε ο υποδόριος ιστός. Αυτός διανοίχθηκε με τη σειρά του και αποκαλύφθηκε ο θηλαίος κόλπος. Στη συνέχεια, με νέα λεπίδα, διανοίχθηκε περαιτέρω ο υποδόριος ιστός και αποκαλύφθηκε ο θηλαίος πόρος. Τέλος, με δύο νέες λεπίδες γινόταν ελαφρά απόξεση του βλεννογόνου του θηλαίου πόρου και του θηλαίου κόλπου. Στη συνέχεια, η θηλή ελέγχθηκε σε όλο το μήκος της, ώστε να εντοπιστούν τυχόν αλλοιώσεις.

Από κάθε μαστικό αδένα ελήφθησαν δείγματα παρεγχύματος και όλη η θηλή για ιστοπαθολογική εξέταση. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε διάλυμα φορμόλης 10%. Τα ιστοτεμάχια του παρεγχύματος, καθώς και τα ιστοτεμάχια της θηλής που προέκυψαν από επιμήκεις τομές της, εγκλείστηκαν σε παραφίνη και πραγματοποιήθηκαν τομές πάχους 5 μm,

για τη χρώση των οποίων χρησιμοποιήθηκε αιματοξυλίνη-εοσίνη (Merck KGaA, Darmstadt, Γερμανία).

Βακτηριολογική εξέταση

Όλα τα δείγματα που συλλέχθηκαν (συγκεκριμένα: βύσματα από τη δειγματοληψία του δέρματος, υλικό θηλαίου πόρου, γάλα, βύσματα από τη στοματική κοιλότητα των αρνιών, ξέσματα από το θηλαίο πόρο, ξέσματα από το θηλαίο κόλπο, δείγματα ιστών), καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία με αιματούχο (5% πρόβειο αίμα) άγαρ Columbia, τα οποία επωάστηκαν σε αερόβιο περιβάλλον σε θερμοκρασία 37 °C έως και 72 ώρες. Η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών που αναπτύχθηκαν, έγινε με καθιερωμένες βακτηριολογικές εξετάσεις (Barrow & Feltham 1993, Euzeby 1997) και τις ταχείες δοκιμές API (BioMerieux S.A., Marcy-l'-Etoile, Γαλλία).

Υπολογισμοί και στατιστική ανάλυση

Για την ανάλυση των βακτηριολογικών ευρημάτων μετά την ημέρα D0, χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι ανάλυσης επιβίωσης. Έτσι υπολογίστηκε η πιθανότητα νέας μόλυνσης (όπως αποδεικνύεται από την απομόνωση βακτηρίων από το δείγμα) σε κάθε σημείο δειγματοληψίας για όλα τα ζώα του 1ου πειραματισμού (συγκεκριμένα: στο δέρμα της κάτω επιφάνειας της θηλής του μαστού, στο θηλαίο πόρο, στο μαστικό αδένα) και για όλα τα ζώα του 2ου πειραματισμού (συγκεκριμένα: στο θηλαίο πόρο, στο μαστικό αδένα).

Για την ανάπτυξη και την εκτίμηση της ανάλυσης επιβίωσης έγιναν οι παρακάτω παραδοχές: (α) εάν είχε απομονωθεί κάποιο βακτήριο σε κάποια δειγματοληψία, αλλά όχι στην αμέσως επόμενη, η μόλυνση είχε αποδράσει στο μέσον του χρονικού διαστήματος μεταξύ των δύο δειγματοληψιών, (β) εάν δεν είχε απομονωθεί κάποιο βακτήριο σε κάποια δειγματοληψία, αλλά είχε απομονωθεί στην επόμενη, η μόλυνση είχε γίνει στο μέσον του χρονικού διαστήματος μεταξύ των δύο δειγματοληψιών, (γ) εάν είχε απομονωθεί κάποιο βακτήριο σε δύο συνεχείς δειγματοληψίες, η μόλυνση είχε διατηρηθεί για όλο αυτό το χρονικό διάστημα και (δ) μέχρι να απομονωθεί κάποιο βακτήριο, το σημείο δειγματοληψίας βρισκόταν σε κίνδυνο μόλυνσης, ενώ μετά την απομόνωση κάποιου βακτηρίου δεν βρισκόταν πλέον σε κίνδυνο μόλυνσης.

Τα ευρήματα στο αριστερό ημιμόριο (1ος πειραματισμός: **A+/M+**, 2ος πειραματισμός: **A+/M-**) συγκρίθηκαν με αυτά στο δεξιό ημιμόριο (1ος πειραματισμός: **A-/M+**, 2ος πειραματισμός: **A-/M-**) του ίδιου ζώου. Σε κάθε χρονικό σημείο δειγματοληψίας, οι διαφορές αξιολογήθηκαν με τη δοκιμή Wilcoxon signed-rank. Προκειμένου για διωνυμικές κατανομές χρησιμοποιήθηκε η δοκιμή "Sign".

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε χρησιμοποιώντας τα προγράμματα Stata-9 (Stata Corporation LP, College Station, ΗΠΑ) και Minitab 14 (Minitab Inc., State College, ΗΠΑ).

Κατά τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η τιμή $P < 0,05$ για τον ορισμό της σημαντικότητας.

Αποτελέσματα

Ευρήματα πριν τον ενοφθαλμισμό

Όλες οι προβατίνες ήταν κλινικά υγιείς από τον τοκετό μέχρι την έναρξη του πειραματισμού. Οι θηλές του μαστού ήταν μαλακές, χωρίς αλλοιώσεις.

Στα δείγματα από το δέρμα της κάτω επιφάνειας της θηλής του μαστού (1ος πειραματισμός) απομονώθηκε μία ποικιλία βακτηρίων, η πλειονότητα των οποίων ήταν πηκτάση-αρνητικοί σταφυλόκοκκοι. Σε ορισμένες περιπτώσεις απομονώθηκαν και άλλα βακτήρια, όπως *Bacillus* spp. ή *Acinetobacter* spp.. Δεν απομονώθηκαν βακτήρια από το υλικό του θηλαίου πόρου και από το γάλα.

Η αντίδραση της δοκιμής CMT ήταν αρνητική ($< "1"$) σε όλα τα δείγματα. Στα επιχρίσματα γάλακτος δεν παρατηρήθηκαν λευκοκύτταρα.

Κλινικά ευρήματα μετά τον ενοφθαλμισμό

1ος πειραματισμός

Στα αριστερά ημιμόρια (**A+/M+**), παρατηρήθηκε κλινική μαστίτιδα (διόγκωση αδένων, μεταβολή στη σύσταση του μαστικού εκκρίματος) σε 4 από τις 12 (33%) προβατίνες και υποκλινική μαστίτιδα στις υπόλοιπες 8 από τις 12 (67%) προβατίνες. Στις θηλές παρατηρήθηκαν δερματικές αλλοιώσεις, οι οποίες περιορίζονταν στην κάτω επιφάνειά της. Στην κλίμακα των Fox και συν. (1991), η τιμή της βαρύτητας των αλλοιώσεων ήταν "2" έως "3".

Στα δεξιά ημιμόρια (**A-/M+**), παρατηρήθηκε υποκλινική μαστίτιδα σε 1 από τις 12 (8%) προβατίνες. Στις θηλές δεν παρατηρήθηκαν αλλοιώσεις.

2ος πειραματισμός

Στα αριστερά ημιμόρια (**A+/M-**), παρατηρήθηκε κλινική μαστίτιδα (διόγκωση αδένων, μεταβολή στη σύσταση του εκκρίματος) σε 2 από τις 8 (25%) προβατίνες και υποκλινική μαστίτιδα σε μία άλλη από τις 8 (13%) προβατίνες. Μία από τις προβατίνες με κλινική μαστίτιδα, πέθανε την ημέρα D5. Στις θηλές παρατηρήθηκαν δερματικές αλλοιώσεις, οι οποίες περιοριζόνταν στην κάτω επιφάνειά της. Στην κλίμακα των Fox και συν. (1991), η τιμή της βαρύτητας των αλλοιώσεων ήταν "2" έως "3".

Στα δεξιά ημιμόρια (**A-/M-**), δεν παρατηρήθηκε μαστίτιδα, ούτε αλλοιώσεις στις θηλές.

Βακτηριολογικά και κυτταρολογικά ευρήματα μετά τον ενοφθαλμισμό

1ος πειραματισμός

Συγκεντρωτικά, από το αριστερό ημιμόριο (**A+/M+**), απομονώθηκε *M. haemolytica* ως εξής: από 84 από τα 120 βύσματα από τη δειγματοληψία δέρματος, από 75 από τα 120 δείγματα υλικού θηλαίου πόρου και από 44 από τα 120 δείγματα γάλακτος. Από το δεξιό ημιμόριο (**A-/M+**), απομονώθηκε το βακτήριο ως εξής: από 65, 25 και 1 από τα 120 αντίστοιχα δείγματα.

Το βακτήριο απομονώθηκε από τα βύσματα από τη δειγματοληψία δέρματος (αριστερή και δεξιά θηλή) την ημέρα D1 (απαιτούμενο χρονικό διάστημα για την απομόνωσή του: 0,5 ημέρα) όλων των ζώων (12 από τα 12 ζώα, 100%) και για χρονικό διάστημα 4 έως 12,5 ημερών. Η διάμεση τιμή της χρονικής διάρκειας απομόνωσης του μικροοργανισμού ήταν 8,5 ημέρες για την αριστερή και 6 ημέρες για τη δεξιά θηλή ($P=0,018$).

Το βακτήριο απομονώθηκε από δείγματα υλικού του θηλαίου πόρου (αριστερή και δεξιά θηλή) κάθε προβατίνας (12 από τα 12 ζώα, 100%). Η διάμεση τιμή του απαιτούμενου χρονικού διαστήματος για την απομόνωσή του από τον αριστερό θηλαίο πόρο ήταν 0,5 ημέρα, ενώ από το δεξιό θηλαίο πόρο ήταν 2,5 ημέρες ($P=0,003$). Η διάμεση τιμή της χρονικής διάρκειας απομόνωσής του ήταν 7,25 ημέρες για τον αριστερό θηλαίο πόρο και 2 ημέρες για το δεξιό ($P=0,003$).

Το βακτήριο απομονώθηκε από δείγματα γάλακτος του αριστερού μαστικού αδένος κάθε προβατίνας (12 από τα 12 ζώα, 100%), καθώς και από δείγματα γάλακτος του δεξιού μαστικού αδένος ενός από τα 12 ζώα (8,3%) ($P=0,003$). Η διάμεση τιμή της χρονικής διάρκειας απομόνωσής του ήταν 4 ημέρες (διακύμανση: 1-7,5 ημέρες) για τον αριστερό μαστικό αδένος, ενώ η τιμή της χρονικής διάρκειας απομόνωσης από το δεξιό μαστικό αδένος ήταν 1 ημέρα.

Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στη χρονική διάρκεια απομόνωσης μεταξύ των δύο στελεχών *M. haemolytica* που ενοφθαλμίστηκαν. Η διάμεση τιμή της χρονικής διάρκειας απομόνωσης και των δύο στελεχών από τα βύσματα από τη δειγματοληψία δέρματος ήταν 8,5 ημέρες και για τα δύο στελέχη ($P>0,400$). Οι αντίστοιχες τιμές για το υλικό θηλαίου πόρου ήταν 6 ημέρες για το στέλεχος VSM08L και 8,5 ημέρες για το στέλεχος DAG21R ($P=0,176$). Για το γάλα, ήταν 3 ημέρες για το στέλεχος VSM08L και 4 ημέρες για το στέλεχος DAG21R, αντίστοιχα ($P=0,324$).

Θετική αντίδραση ($\geq 1''$) στη δοκιμή CMT παρατηρήθηκε σε 89 από τα 120 δείγματα γάλακτος από τον αριστερό (**A+/M+**) και σε 17 από τα 120 δείγματα γάλακτος από το δεξιό (**A-/M+**) μαστικό αδένα. Στα επιχρίσματα γάλακτος παρατηρήθηκαν κυρίως ($\geq 75\%$) ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα II.iv και στις Εικόνες II.1 και II.2.

Πίνακας II.iv. Βακτηριολογικά ευρήματα (απομόνωση *M. haemolytica*) και αποτελέσματα της δοκιμής CMT μετά από πρόκληση αλλοιώσεων σε θηλές του μαστού προβατίνων και επάλειψη ζωμού με καλλιέργεια *M. haemolytica*.

	Αριστερό ημιμόριο (A+/M+)		Δεξιό ημιμόριο (A-/M+)	
	Ομάδα Α	Ομάδα Β	Ομάδα Α	Ομάδα Β
Απομόνωση <i>M. haemolytica</i>				
Βύσματα από τη δειγματοληψία δέρματος	43/60 [10/60]	41/60 [9/60]	31/60 [3/60]	34/60 [4/60]
Υλικό θηλαίου πόρου	36/60	39/60	11/60	14/60
Γάλα	20/60	24/60	0/60	1/60
Αποτελέσματα δοκιμής CMT				
Θετική αντίδραση ($\geq 1''$)	43/60	46/60	7/60	10/60

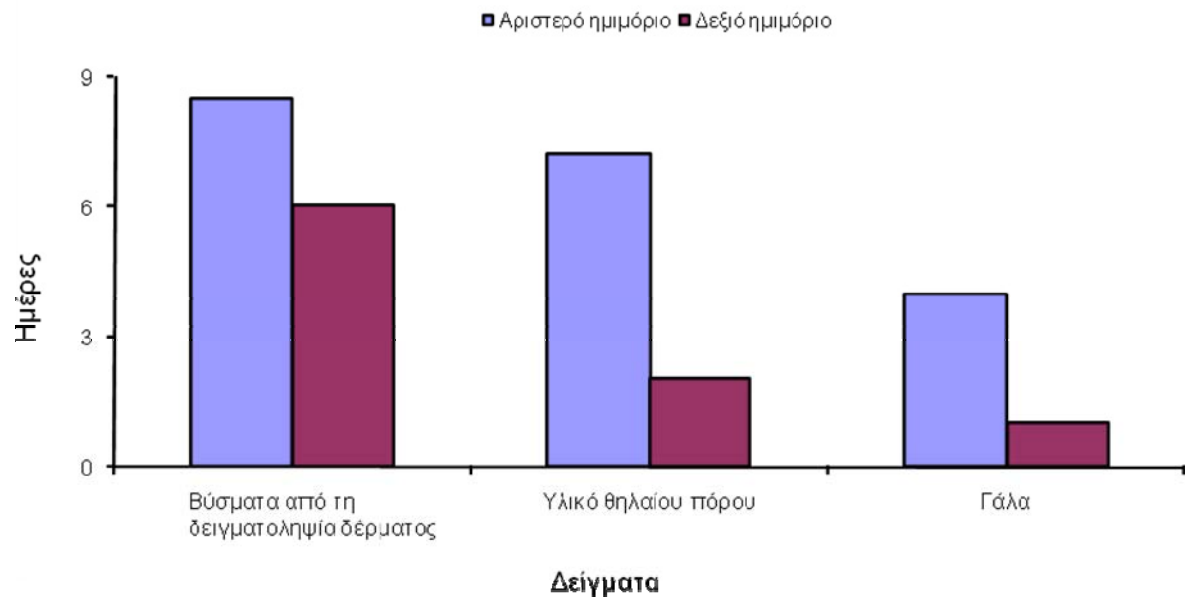
A: πρόκληση αλλοιώσεων, **M:** επάλειψη ζωμού με καλλιέργεια *M. haemolytica*.

Ομάδα Α στέλεχος VSM08L - ομάδα Β στέλεχος DAG21R, επάλειψη στο δέρμα γύρω από το στόμιο της θηλής.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως n/m=θετικά αποτελέσματα στο σύνολο των δειγμάτων που ελήφθησαν. Οι αριθμοί στις αγκύλες εκφράζουν την αναλογία απομόνωσης άλλων (εκτός *M. haemolytica*) μικροοργανισμών.

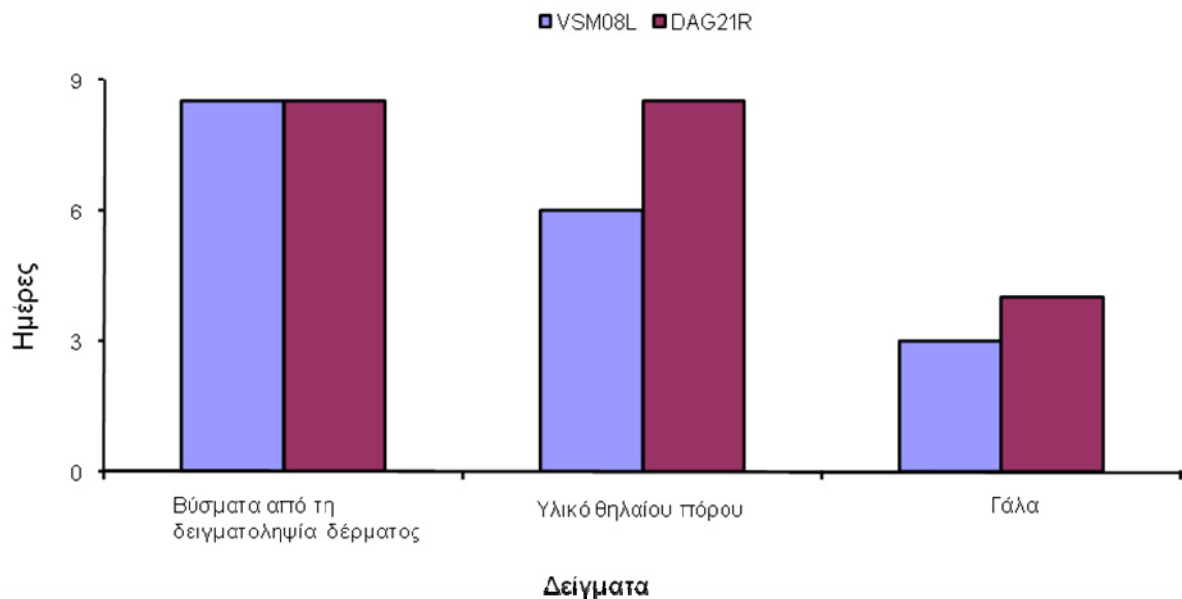
Εικόνα II.1. Διάμεση τιμή της χρονικής διάρκειας απομόνωσης *M. haemolytica* από διάφορα δείγματα από το μαστό προβατίνων, μετά από πρόκληση αλλοιώσεων στις θηλές του μαστού και επάλειψη ζωμού με καλλιέργεια *M. haemolytica*.

Σύγκριση αποτελεσμάτων σε ημιμόρια των οποίων η θηλή είχε αλλοιώσεις (αριστερά: **A+/M+**), με αποτελέσματα σε ημιμόρια των οποίων η θηλή δεν είχε αλλοιώσεις (δεξιά: **A-/M+**).



Εικόνα II.2. Διάμεση τιμή της χρονικής διάρκειας απομόνωσης *M. haemolytica* από διάφορα δείγματα από το μαστό προβατίνων, μετά από πρόκληση αλλοιώσεων στις θηλές του μαστού και επάλειψη ζωμού με καλλιέργεια *M. haemolytica*.

Σύγκριση αποτελεσμάτων σε ημιμόρια στα οποία έγινε επάλειψη καλλιέργειας με στέλεχος από μαστό προβατίνας (VSM08L) με αποτελέσματα σε ημιμόρια στα οποία έγινε επάλειψη καλλιέργειας με στέλεχος από ανώτερη αναπνευστική οδό αρνιών (DAG21R).



2ος πειραματισμός

Βακτήρια απομονώθηκαν από δείγματα υλικού του αριστερού θηλαίου πόρου (**A+/M-**) επτά ζώων από τα οκτώ (88%) και του δεξιού θηλαίου πόρου (**A-/M-**) ενός ζώου από τα οκτώ (13%) ($P=0,03$). Η διάμεση τιμή της χρονικής διάρκειας απομόνωσης βακτηρίων ήταν 4 ημέρες για τον αριστερό και για το δεξιό θηλαίο πόρο.

Βακτήρια απομονώθηκαν από τα δείγματα γάλακτος από τον αριστερό μαστικό αδένα τριών ζώων από τα οκτώ (38%), ενώ δεν απομονώθηκαν από κανένα δείγμα γάλακτος από το δεξιό μαστικό αδένά κανενός ζώου (0%) ($P=0,063$).

Βακτήρια (*Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus* και *M. haemolytica*) απομονώθηκαν από 16 από τα 72 δείγματα υλικού θηλαίου πόρου και από 5 από τα 72 δείγματα γάλακτος του αριστερού ημιμορίου. Τα αντίστοιχα αποτελέσματα για το δεξιό ημιμόριο ήταν 2 και 0 (*Bacillus* spp.).

M. haemolytica απομονώθηκε από 50 από τα 64 βύσματα από την ανώτερη αναπνευστική οδό των αρνιών.

Θετική αντίδραση ($\geq 1''$) στη δοκιμή CMT παρατηρήθηκε σε 36 από τα 72 δείγματα γάλακτος από τον αριστερό (**A+/M-**) και σε 6 από τα 72 δείγματα γάλακτος από το δεξιό (**A-/M-**) μαστικό αδένα. Η πλειονότητα ($\geq 75\%$) των λευκοκυττάρων που παρατηρήθηκαν στα επιχρίσματα μαστικού εκκρίματος με θετική αντίδραση στη δοκιμή CMT, ήταν ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με περισσότερες λεπτομέρειες στον Πίνακα II.v.

Πίνακας II.v. Βακτηριολογικά ευρήματα (απομόνωση *S. epidermidis*, *S. aureus* και *M. haemolytica*) και αποτελέσματα της δοκιμής CMT μετά από πρόκληση αλλοιώσεων σε θηλές του μαστού προβατίνων και θηλασμό αρνιών.

	Αριστερό ημιμόριο (A+/M-)	Δεξιό ημιμόριο (A-/M-)
Απομόνωση <i>M. haemolytica</i>		
Υλικό θηλαίου πόρου	16/72	2/72
Γάλα	5/72	0/72
Αποτελέσματα δοκιμής CMT		
Θετική αντίδραση ($\geq 1''$)	36/72	6/72

A: πρόκληση αλλοιώσεων, **M:** ενοφθαλμισμός *M. haemolytica*.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως n/m=θετικά αποτελέσματα στο σύνολο των δειγμάτων που ελήφθησαν.

Παθολογοανατομικά ευρήματα

1ος πειραματισμός

M. haemolytica απομονώθηκε σε καθαρή καλλιέργεια από 5 από τα 36 δείγματα ιστών από τα αριστερά ημιμόρια (**A+/M+**) του μαστού των ζώων. Δεν απομονώθηκε από κανένα δείγμα ιστών από τα δεξιά ημιμόρια (**A-/M+**) του μαστού των ζώων.

Στα αριστερά ημιμόρια, τα κύρια μακροσκοπικά ευρήματα στη θηλή ήταν πτυχωσεις, πετέχειες και πάχυνση του βλεννογόνου του θηλαίου κόλπου. Στο δέρμα του κατώτερου άκρου της θηλής παρατηρήθηκαν ήπια διάβρωση και εφελκίδες. Στο μαστικό παρέγχυμα παρατηρήθηκε υποδόριο οίδημα και ήπια συμφόρηση των αγγείων.

Ιστολογικά, παρατηρήθηκε εκτεταμένη ίνωση, ιδιαίτερα στο κάτω άκρο της θηλής. Σε όλες τις θηλές, στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου, παρατηρήθηκε συνάθροιση λεμφοκυττάρων με εικόνα χαρακτηριστική θυλακίου, με ή χωρίς ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα και βλαστική δραστηριότητα. Στο δέρμα του κατώτερου άκρου της θηλής, ήταν χαρακτηριστική η παρουσία μεγάλου αριθμού ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων στο χόριο.

Στο μαστικό παρέγχυμα, τα ιστοπαθολογικά ευρήματα περιλάμβαναν λευκοκυτταρική διήθηση από μακροφάγα, λεμφοκύτταρα και ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα, λύση ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων, αποδιοργάνωση της αρχιτεκτονικής δομής επιθηλιακών κυττάρων και αδενοκυψελών και εκτεταμένη παρουσία ινοβλαστών.

Στα δεξιά ημιμόρια δεν υπήρχαν παθολογικά μακροσκοπικά ή ιστολογικά ευρήματα.

2ος πειραματισμός

M. haemolytica απομονώθηκε σε καθαρή καλλιέργεια από όλα τα δείγματα ιστών από το αριστερό ημιμόριο (**A+/M-**) του μαστού της προβατίνας που πέθανε (D5). Δεν απομονώθηκαν βακτήρια από το δεξιό ημιμόριο (**A-/M+**).

Στην αριστερή θηλή, παρατηρήθηκαν πτυχωσεις, υπεραιμία και πάχυνση του βλεννογόνου του θηλαίου κόλπου. Στο δέρμα του κατώτερου άκρου της θηλής μακροσκοπικά παρατηρήθηκαν ήπια διάβρωση και παρουσία εφελκίδων. Στο αριστερό μαστικό παρέγχυμα παρατηρήθηκαν οι χαρακτηριστικές αλλοιώσεις μαστίτιδας από *M. haemolytica*. Τα κύρια ευρήματα ήταν έντονη διόγκωση, υποδόριο οίδημα και υποδόριο εμφύσημα στο μαστικό αδένα, περιοχές με αιμορραγίες στο παρέγχυμα και παρουσία πυώδους συλλογής σε διάφορα σημεία του παρεγχύματος. Επίσης, παρατηρήθηκε συμφόρηση και διάταση των αγγείων. Τα επιχώρια λεμφογάγγλια ήταν έντονα διογκωμένα και οίδηματικά.

Το κύριο ιστοπαθολογικό εύρημα στη θηλή ήταν η παρουσία αυξημένου αριθμού ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων και λεμφοκυττάρων κάτω από το βασικό υμένα του επιθηλίου του θηλαίου πόρου και του θηλαίου κόλπου, η οποία ήταν διάχυτη και στα βαθύτερα στρώματά του. Επίσης, παρατηρήθηκε παρουσία πλασμοκυττάρων και ρήξη του τοιχώματος των αγγείων, με αποτέλεσμα την παρουσία ερυθρών αιμοσφαιρίων τόσο στο επιθήλιο όσο και στον αυλό της θηλής. Στο δέρμα του κατώτερου άκρου της θηλής, ήταν χαρακτηριστική η παρουσία μεγάλου αριθμού ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων στο χόριο.

Στο μαστικό παρέγχυμα, το κύριο ιστοπαθολογικό εύρημα ήταν διήθηση από ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα. Άλλες αλλοιώσεις ήταν ρήξη του τοιχώματος των αγγείων, αιμορραγίες, λύση των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων και καταστροφή των επιθηλιακών κυττάρων και των αδενοκυψελών.

Στο δεξιό ημιμόριο δεν υπήρχαν παθολογικά μακροσκοπικά ή ιστολογικά ευρήματα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ III

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΟΣ
***MANNHEIMIA HAEMOLYTICA* ΣΤΗ ΜΙΑ ΘΗΛΗ**
ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΤΩΝ ΠΡΟΒΑΤΩΝ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το βακτήριο *Mannheimia haemolytica* είναι σημαντικός αιτιολογικός παράγοντας της μαστίτιδας (Menzies & Ramanoon 2001, Bergonier & Berthelot 2003). Σε προηγούμενες μελέτες (Gougoulis, Kyriazakis, Tzora, Taitzoglou, Skoufos & Fthenakis 2008) αποδείχθηκε η δυνατότητα μετάδοσης του μικροοργανισμού κατά το θηλασμό των αρνιών. Τα γεγονότα που λαμβάνουν χώρα κατά τη διείσδυση του μικροοργανισμού στη θηλή του μαστού της προβατίνας δεν έχουν περιγραφεί πλήρως. Ιδιαίτερα, η αντίδραση του ζώου κατά την οξεία φάση της μόλυνσης δεν είναι επαρκώς γνωστή.

Στο παρόν κεφάλαιο περιγράφονται δύο διαδοχικοί πειραματισμοί. Σκοπός του πρώτου πειραματισμού, ήταν η ακριβής περιγραφή των εξεργασιών αμέσως μετά την εναπόθεση μικροβίων (*M. haemolytica*) εντός της θηλής του μαστού, κατάσταση η οποία προσομοιάζει με τη φυσική μόλυνση, χρησιμοποιώντας κλινικές, υπερηχοτομογραφικές, βακτηριολογικές, κυτταρολογικές, αιματολογικές, φυσικοχημικές, παθολογοανατομικές και ανοσοϊστοχημικές τεχνικές. Σκοπός του δεύτερου πειραματισμού, ήταν η εξακρίβωση της παθογόνου δράσης για το μαστικό αδέννα ενός στελέχους *M. haemolytica* που είχε απομονωθεί από την ανώτερη αναπνευστική οδό αρνιών ("αναπνευστικό" στέλεχος).

B. ΣΥΝΕΠΕΙΕΣ ΤΟΥ ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΟΥ ΕΝΟΣ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ *MANNHEIMIA HAEMOLYTICA* ΣΤΗ ΘΗΛΗ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΤΩΝ ΠΡΟΒΑΤΩΝ

Υλικά και μέθοδοι

Πειραματικός σχεδιασμός

Ο πειραματισμός πραγματοποιήθηκε μετά από εξασφάλιση σχετικής άδειας από τη Διεύθυνση Κτηνιατρικής της Νομαρχιακής Αυτοδιοίκησης Καρδίτσας. Σε αυτόν χρησιμοποιήθηκαν 25 ενήλικες προβατίνες Καραγκούνικης φυλής (ηλικίας 3 έως 5 ετών), κατά τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου τους. Τα ζώα προέρχονταν από εκτροφή της περιοχής Καρδίτσας. Η διαχείριση των ζώων κατά τη διάρκεια του πειραματισμού, ήταν όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο II, Τμήμα Β).

Τα αρνιά τους απογαλακτίστηκαν τη 18η ημέρα μετά τον τοκετό. Στη συνέχεια, τα πειραματόζωα αρμέγονταν, πάντοτε από το ίδιο άτομο, τρεις φορές καθημερινά. Μία θηλή του μαστού κάθε ζώου ενοφθαλμίστηκε με 1.250 cfu (διακύμανση: 1.210-1.280 cfu) *M. haemolytica*, στέλεχος VSM08L, δύο ημέρες αργότερα (20ή ημέρα της γαλακτικής περιόδου).

Προετοιμασία του ενοφθαλμίσματος και τεχνική ενοφθαλμισμού

Το δέρμα του μαστού και των θηλών των ζώων προετοιμάστηκαν, όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο II, Τμήμα Β).

Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε για τους ενοφθαλμισμούς, καλλιεργήθηκε όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο II, Τμήμα Β). Πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις του ζωμού με την καλλιέργεια των βακτηρίων σε σωληνάρια με στείρο φωσφορικό διάλυμα με pH 7,3 (PBS) (PBS Dulbecco-Biochrom AG, Berlin, Γερμανία). Στη συνέχεια, έγινε αναρρόφηση 0,2 mL του τελικού διαλύματος χρησιμοποιώντας σύριγγα ινσουλίνης. Ο αριθμός των βακτηριακών κυττάρων (cfu) στο ενοφθάλμισμα προσδιορίστηκε με βάση τη μέθοδο των Miles και Misra (1938).

Για τον ενοφθαλμισμό (ημέρα D0), χρησιμοποιήθηκε στείρος, λεπτός, πλαστικός καθετήρας 20 G (Abbocath[®]), από τον οποίο είχε αφαιρεθεί ο μεταλλικός οδηγός - βελόνα. Ο

καθετήρας είχε κοπεί σε μήκος 2 mm με στείρα λεπίδα χειρουργικού νυστεριού. Για τον ακριβή προσδιορισμό του σημείου τομής, χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένος μεταλλικός χάρακας, τοποθετημένος ακριβώς δίπλα στον καθετήρα. Η όλη διαδικασία πραγματοποιούνταν επάνω σε αποστειρωμένη χειρουργική οθόνη, ο δε χειριστής φορούσε χειρουργικά γάντια. Το ζώο καταρρίφθηκε και στη συνέχεια συγκρατήθηκε σε τέτοια θέση, ώστε η περινεϊκή χώρα του ακουμπούσε στο δάπεδο και η ράχη του στηριζόταν στα πόδια ενός βοηθού. Στη συνέχεια, η θηλή του μαστού απολυμάνθηκε με διάλυμα ιωδιούχου ποβιδόνης, καθαρίστηκε με αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό και σκουπίστηκε με αποστειρωμένη γάζα. Μετά την εισαγωγή του καθετήρα στη θηλή και την προσαρμογή της σύριγγας σε αυτόν, έγινε η έγχυση του ενοφθαλμίσματος στο θηλαίο πόρο.

Η ίδια ακριβώς τεχνική εφαρμόστηκε για την έγχυση 0,2 mL στείρου PBS, στο αντίστοιχο σημείο της άλλης θηλής του μαστού κάθε ζώου.

Εξετάσεις πριν και μετά τον ενοφθαλμισμό

Κλινική εξέταση

Αμέσως μετά τον τοκετό και στη συνέχεια, κάθε δύο ημέρες, έως και την ημέρα D-2, όπως επίσης και την ημέρα D-1, πραγματοποιούνταν γενική κλινική εξέταση των ζώων, καθώς και κλινική εξέταση των μαστικών αδένων και των θηλών τους. Μετά τον ενοφθαλμισμό (ημέρα D0), συγκεκριμένα 2 h, 4 h, 8 h, 12 h και 18 h μετά από αυτόν, καθώς και τις ημέρες D1, D2, D3, D4 και D5 (εκτός εάν κάποια προβατίνα είχε θανατωθεί νωρίτερα) γίνονταν κλινική εξέταση των ζώων. Στα ίδια χρονικά σημεία πραγματοποιούνταν επίσης δειγματοληψίες.

Η κλινική εξέταση έγινε όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο II, Τμήμα Β).

Υπερηχοτομογραφική εξέταση

Η υπερηχοτομογραφική εξέταση των μαστικών αδένων και των θηλών γινόταν με το ζώο σε όρθια θέση. Χρησιμοποιήθηκε μονάδα υπερηχοτομογραφίας (τύπος AMI B7 - Alliance Medical, Quebec, Καναδάς), στην οποία ήταν προσαρμοσμένη κεφαλή τύπου sector, ρυθμισμένη στη συχνότητα των 6,0 MHz. Κατά την εξέταση χρησιμοποιήθηκε βάθος απεικόνισης 40 mm.

Για την επίτευξη καλύτερης απεικόνισης, οι θηλές του μαστού πληρώνονταν με γάλα, μετά από ήπια πίεση του γαλακτοφόρου κόλπου. Η κεφαλή τοποθετούνταν επάνω στην επιφάνεια της θηλής του μαστού και περιστρεφόταν γύρω από αυτήν. Στη συνέχεια, κινούνταν κατά μήκος του κατακόρυφου άξονα της θηλής, από τη βάση έως την κορυφή της, ώστε να

απεικονιστούν ο θηλαίος κόλπος και ο θηλαίος πόρος. Ολόκληρη η θηλή του μαστού απεικονιζόταν σε ένα πεδίο (Mavrogianni, Fthenakis, Burriel, Gouletsou, Papaioannou & Taitzoglou 2004).

Δειγματοληψίες

Λαμβάνονταν δείγματα υλικού θηλαίου πόρου και γάλακτος όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο II, Τμήμα Β). Σε κάθε περίπτωση λαμβάνονταν δείγματα και από τα δύο ημιμόρια του μαστού κάθε ζώου (κάθε ημιμόριο αποτελείται από τη θηλή και το σύστοιχο μαστικό αδένα). Επιπλέον, συλλέγονταν δείγματα αίματος από τη μία σφαγίτιδα φλέβα του ζώου, σε φιαλίδια που περιείχαν EDTA.

Κυτταρολογική εξέταση

Σε κάθε δείγμα γάλακτος πραγματοποιήθηκε η δοκιμή CMT. Επιπλέον, παρασκευάζονταν επιχρίσματα από το δείγμα γάλακτος για χρώση Giemsa. Λεπτομέρειες περιγράφηκαν προηγουμένως (Κεφάλαιο II, Τμήμα Β).

Αιματολογική εξέταση

Γινόταν προσδιορισμός του αιματοκρίτη με χρήση σωλήνα Wintrobe. Ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων στο αίμα υπολογίστηκε με τη βοήθεια αιματοκυτόμετρου (πλάκα τύπου Neubauer). Επιπλέον, παρασκευάζονταν επιχρίσματα από το δείγμα αίματος για χρώση Giemsa (Merck KGaA, Darmstadt, Γερμανία) και γινόταν προσδιορισμός του λευκοκυτταρικού τύπου.

Προσδιορισμός του pH και της σύνθεσης του γάλακτος

Ο προσδιορισμός του pH του γάλακτος γινόταν εντός 30 min μετά τη λήψη του δείγματος, χρησιμοποιώντας ψηφιακό πεχάμετρο (pH 525, LAB pH meter - WTW, Weilheim, Germany). Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας του γάλακτος σε λίπος, ολικές πρωτεΐνες και λακτόζη γινόταν με αυτόματο αναλυτή (Milkoscan FT120 - Fosselectric, Hillerod, Δανία).

Μακροσκοπική παθολογοανατομική εξέταση

Σε όλα τα ζώα, έγινε ευθανασία κάτω από γενική αναισθησία. Σε καθένα από τα παρακάτω χρονικά σημεία μετά τον ενοφθαλμισμό: 4 h μετά τον ενοφθαλμισμό, 12 h μετά τον ενοφθαλμισμό, ημέρα D1, ημέρα D3 και ημέρα D5 έγινε ευθανασία σε πέντε πειραματόζωα. Σε

κάθε ζώο, πραγματοποιήθηκε νεκροτομή και ελήφθησαν δείγματα ιστών για βακτηριολογική εξέταση, όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο II, Τμήμα Β).

Βακτηριολογική εξέταση

Όλα τα δείγματα που συλλέχθηκαν (συγκεκριμένα: υλικό θηλαίου πόρου, γάλα, ξέσματα από το θηλαίο πόρο, ξέσματα από το θηλαίο κόλπο, δείγματα ιστών), καλλιεργήθηκαν όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο II, Τμήμα Β).

Ιστοπαθολογική και ανοσοϊστοχημική εξέταση

Από κάθε μαστικό αδένα ελήφθησαν δείγματα παρεγχύματος για ιστοπαθολογική εξέταση. Στη συνέχεια, κάθε θηλή χωρίστηκε σε δύο τμήματα με επιμήκη τομή. Στο δείγμα παρεγχύματος και στο ένα τμήμα της θηλής, έγινε επεξεργασία για ιστοπαθολογική εξέταση όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο II, Τμήμα Β).

Η άλλη μισή θηλή των ζώων στα οποία έγινε ευθανασία τις ημέρες D3 και D5, καθώς επίσης και δείγματα από τα μαστικά λεμφογάγγλια όλων των ζώων, χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοϊστοχημική εξέταση. Αρχικά, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε διάλυμα αλάτων ψευδαργύρου (Gonzalez, Anderson, Deane, Summers & Buxton 2001). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν αφυδάτωση με εμβάπτιση σε σειρά διαβαθμισμένων διαλυμάτων αλκοόλης, έγκλειση σε παραφίνη και πραγματοποίηση τομών πάχους 5 μm . Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε ανοσοϊστοχημικό προσδιορισμό των υπο-πληθυσμών λευκοκυττάρων. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ABC (Abidin Biotin Complex) για την εντόπιση μονοκλωνικών αντισωμάτων ειδικών για τα Β-λεμφοκύτταρα (αντιγόνο CD79, αcy , κλώνος *HM57*, διάλυση 1:100), τα Τ-λεμφοκύτταρα (αντιγόνο CD3, κλώνος *f7.2.38*, διάλυση 1:200 και αντιγόνο $\gamma\delta$ -Τ-λεμφοκύτταρα, κλώνος *CC15-240297*, διάλυση 1:5000), τα Τ-βοηθητικά λεμφοκύτταρα (αντιγόνο CD4, κλώνος *17D/1*, διάλυση 1:2000), τα Τ-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα (αντιγόνο CD8, κλώνος *7C2*, 1:200), τα μακροφάγα (αντιγόνο CD68, κλώνος *EBN11*, διάλυση 1:500) και τους παράγοντες του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας 2ης τάξης (αντιγόνο MHC-II, κλώνος *SW73.2*, διάλυση 1:1000).

Ως αρνητικός μάρτυρας για τα αντί-CD79, αντί-CD3, αντί-CD4 και αντί-CD68 αντισώματα χρησιμοποιήθηκε ανοσοσφαιρίνη IgG₁ ποντικού (κλώνος *MOPC21*), για τα αντί- $\gamma\delta$ -Τ-λεμφοκύτταρα και αντί-CD8 αντισώματα χρησιμοποιήθηκε ανοσοσφαιρίνη IgG_{2a} ποντικού (κλώνος *VPM20*) και για τα αντί-MHC-II χρησιμοποιήθηκε ανοσοσφαιρίνη IgG αρουραίου. Στη διαδικασία συμπεριελήφθησαν και δείγματα ιστών χωρίς πρωτογενή αντισώματα, ώστε αφενός να διασφαλιστεί η ειδικότητα των σημασμένων ειδικών αντισωμάτων του συστήματος και

αφετέρου να αποτραπεί η μη ειδική σύνδεση του δευτερογενούς αντισώματος στα δείγματα των ιστών.

Υπολογισμοί και στατιστική ανάλυση

Σε ό,τι αφορά σε δεδομένα ανά ζεύγη, οι διαφορές μεταξύ των δύο ημιμορίων του μαστού συγκρίθηκαν σε κάθε σημείο δειγματοληψίας, χρησιμοποιώντας τη δοκιμή Wilcoxon signed-rank ή τη δοκιμή Sign, ανάλογα με την περίπτωση. Επιπλέον, λαμβάνονταν υπόψη ότι ο αριθμός των ζώων μειωνόταν σταδιακά. Για τις μεταβλητές που αφορούσαν σε δείγματα από ζωντανά ζώα, χρησιμοποιήθηκε ο συνολικός αριθμός δειγματοληψιών μετά τον ενοφθαλμισμό, για να γίνει προσαρμογή τύπου Bonferroni σε πολλαπλές συγκρίσεις.

Σε ό,τι αφορά στα δεδομένα της αιματολογικής εξέτασης, βρέθηκε ότι δεν υπήρχε ανάγκη μετασχηματισμού πριν την ανάλυσή τους. Έτσι, εξετάστηκαν με βάση το γενικό γραμμικό πρότυπο, λαμβάνοντας υπόψη το χρόνο και το ζώο ως μεταβλητές. Οι διαφορές πριν και μετά τον ενοφθαλμισμό, αξιολογήθηκαν μετά από προσαρμογή τύπου Bonferroni σε πολλαπλές συγκρίσεις.

Για την εκτίμηση της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων αναπτύχθηκε ένα σύστημα αξιολόγησης, με βάση το οποίο δόθηκαν αριθμητικές τιμές σε όλα τα μακροσκοπικά και μικροσκοπικά ευρήματα στις θηλές και το μαστικό παρέγχυμα των ζώων. Η κλίμακα βαθμολόγησης κυμαινόταν από 0 έως 4 και ήταν διαφορετική για τα μακροσκοπικά και τα μικροσκοπικά ευρήματα στη θηλή και στο μαστικό παρέγχυμα. Στη συνέχεια, τα επιμέρους αποτελέσματα αθροίζονταν, ώστε η συνολική τιμή σε κάθε ημιμόριο (ενοφθαλμισμένο ή μη) του μαστού ενός ζώου κυμαινόταν από 0 έως 16. Το σύστημα βαθμολόγησης παρουσιάζεται στον Πίνακα III.i. Οι διαφορές μεταξύ των δύο ημιμορίων του μαστού συγκρίθηκαν σε κάθε σημείο ευθανασίας, χρησιμοποιώντας τη δοκιμή Wilcoxon signed-rank ή τη δοκιμή Sign.

Για την εκτίμηση των ανοσοϊστοχημικών ευρημάτων στα δείγματα θηλών και μαστικών λεμφογαγγλίων, αναπτύχθηκε μία κλίμακα βαθμολόγησης. Σε αυτήν λήφθηκε υπόψη αρχικά η απουσία / παρουσία χρώσης στα κύτταρα (0: απουσία χρώσης) και στη συνέχεια, η ένταση της ενδεχόμενης χρώσης (1: διακριτή, 2: ήπια, 3: έντονη, 4: πολύ έντονη χρώση), που απεικόνιζε τον αριθμό των αντίστοιχων κυττάρων στον ιστό. Στις θηλές του μαστού, η τελική τιμή κυμαινόταν από 0 έως 4. Στα μαστικά λεμφογάγγλια, βαθμολογήθηκε χωριστά κάθε ανατομική ζώνη τους (πρωτογενή θυλάκια, δευτερογενή θυλάκια: κεντρική ζώνη, δευτερογενή θυλάκια: περιφερική ζώνη, παραφλοιώδης μοίρα, μυελώδης μοίρα). Στη συνέχεια, τα αποτελέσματα των πέντε ζωνών κάθε μαστικού λεμφογαγγλίου αθροίζονταν, ώστε η τελική τιμή σε κάθε μαστικό

λεμφογάγγλιο (δηλαδή, από το ενοφθαλμισμένο ημιμόριο ή από το ημιμόριο-μάρτυρα) κυμαινόταν από 0 έως 20.

Στη συνέχεια, έγινε προσαρμογή των αποτελεσμάτων από κάθε δείκτη λευκοκυττάρων με τη μέθοδο του γενικού γραμμικού προτύπου, ώστε να ληφθεί υπόψη οποιαδήποτε επίδραση του ενοφθαλμισμού και του χρόνου που παρήλθε μετά από αυτόν. Οι παράμετροι υπολογίστηκαν στο πρόγραμμα Genstat 9 (VSN International Ltd, Hemel Hempstead, United Kingdom). Ο ενοφθαλμισμός και ο χρόνος ευθανασίας ορίστηκαν ως σταθερές μεταβλητές, ενώ κάθε ζώο ως τυχαία μεταβλητή στο χρόνο. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε η δοκιμή Kruskal-Wallis για τη σύγκριση των τελικών τιμών στα μαστικά λεμφογάγγλια και τις θηλές μεταξύ του ενοφθαλμισμένου ημιμορίου και του ημιμορίου-μάρτυρα.

Εκτός από το πρόγραμμα Genstat, για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα Minitab 15 (Minitab Inc., State College, PA, ΗΠΑ) και Stata-9 (Stata Corporation LP, College Station, TX, ΗΠΑ).

Κατά τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η τιμή $P < 0,05$ για τον ορισμό της στατιστικής σημαντικότητας.

Πίνακας III.i. Περιγραφή του συστήματος αξιολόγησης της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων στο μαστό (θηλή, μαστικό παρέγχυμα).

Τιμή	Θηλή	
	Μακροσκοπικά νεκροτομικά ευρήματα	Ιστοπαθολογικά ευρήματα
0	Απουσία αλλοιώσεων	Απουσία αλλοιώσεων
1	Πτυχώσεις στο βλεννογόνο	Παρουσία λίγων, διάσπαρτων λευκοκυττάρων
2	Υπεραιμία του βλεννογόνου	Παρουσία αυξημένου αριθμού λευκοκυττάρων, συσσωρευμένων κατά ομάδες κάτω από το επιθήλιο
3	Πάχυνση του βλεννογόνου, με αυξημένο αριθμό πτυχώσεων και παρουσία πετεχειών	Παρουσία αυξημένου αριθμού λευκοκυττάρων, ομοιόμορφα κατανεμημένων κάτω από το επιθήλιο
4	Έντονη πάχυνση του βλεννογόνου, χωρίς σαφή διάκριση της μακροσκοπικής δομής του εσωτερικού	Παρουσία μεγάλου αριθμού λευκοκυττάρων και υπερπλασία των λεμφοειδών δομών στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου
Τιμή	Μαστικό παρέγχυμα	
	Μακροσκοπικά νεκροτομικά ευρήματα	Ιστοπαθολογικά ευρήματα
0	Απουσία αλλοιώσεων	Απουσία αλλοιώσεων
1	Διόγκωση του αδένα, με παρουσία υποδόριου οιδήματος	Παρουσία λίγων, διάσπαρτων λευκοκυττάρων
2	Παρουσία ινικής και πηγμάτων γάλακτος, με εστίες υπεραιμίας στο παρέγχυμα	Παρουσία αυξημένου αριθμού λευκοκυττάρων, συσσωρευμένων κατά ομάδες περι- και ενδοκυψελιδικά
3	Υπεραιμικό παρέγχυμα, με έντονη διαστολή των αιμοφόρων αγγείων	Παρουσία μεγάλου αριθμού λευκοκυττάρων, εξαγγείωση και καταστροφή επιθηλιακών κυττάρων
4	Έντονα αιμορραγικός αδένας, με εκροή μεγάλης ποσότητας οροαιμορραγικού υγρού κατά τη διατομή και εύκολη αποκόλληση των υποκείμενων ιστών	Αιμορραγίες, καταστροφή αδενοκυψελών και απώλεια της εσωτερικής δομής του παρεγχύματος

Αποτελέσματα

Ευρήματα πριν τον ενοφθαλμισμό

Όλες οι προβατίνες ήταν κλινικά υγιείς από τον τοκετό μέχρι την έναρξη του πειραματισμού. Οι θηλές του μαστού ήταν μαλακές, χωρίς αλλοιώσεις.

Υπερηχοτομογραφικά, το δέρμα της θηλής του μαστού και οι υποκείμενοι ιστοί απεικονίζονταν ως ένα παχύ, ομοιογενές, ηχογόνο και καλά διαχωρισμένο στρώμα. Επίσης, υπήρχε έντονη αντίθεση μεταξύ των ιστών και της κοιλότητας της θηλής (Εικόνα III.1α).

Δεν απομονώθηκαν βακτήρια από το υλικό του θηλαίου πόρου και από το γάλα. Η αντίδραση της δοκιμής CMT ήταν αρνητική (<"1") σε όλα τα δείγματα. Στα επιχρίσματα γάλακτος δεν παρατηρήθηκαν λευκοκύτταρα.

Τα αιματολογικά ευρήματα κυμάνθηκαν εντός των φυσιολογικών ορίων (Aitken 2007, Roger 2008). Ο αιματοκρίτης ήταν $36,2\% \pm 1,1\%$ (μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση του μέσου όρου), ο συνολικός αριθμός λευκοκυττάρων ήταν 9.110 ± 362 κύτταρα ανά μL αίματος, ο συνολικός αριθμός ώριμων ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων ήταν 4.349 ± 285 κύτταρα ανά μL αίματος και ο συνολικός αριθμός άωρων ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων ήταν 82 ± 27 κύτταρα ανά μL αίματος (ποσοστό $1,9\%$ επί του συνολικού αριθμού των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων).

Οι τιμές του pH του γάλακτος ήταν εντός των φυσιολογικών ορίων και δεν υπήρχε σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ημιμορίων. Οι τιμές ήταν 6,70 (0,15) και 6,69 (0,11) (διάμεση τιμή, διατεταρτημοριακό εύρος) ($P=1,000$). Ομοίως, δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ημιμορίων στη σύνθεση του γάλακτος. Για το λίπος, οι τιμές ήταν 6,95% (0,72%) και 7,03% (0,55%) ($P>0,5$), για τις ολικές πρωτεΐνες 5,63% (0,73%) και 5,65% (0,75%) ($P>0,5$) και για τη λακτόζη 4,60% (0,40%) και 4,55% (0,38%) ($P>0,4$).

Κλινικά και υπερηχοτομογραφικά ευρήματα μετά τον ενοφθαλμισμό

Παρατηρήθηκαν ήπια κλινικά συμπτώματα (εξοίδηση της θηλής, αντίδραση κατά την ψηλάφηση) 2 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό, σε όλα τα ενοφθαλμισμένα ημιμόρια. Σε 12 από τις 25 προβατίνες, παρατηρήθηκε επίσης μεταβολή στη σύσταση του μαστικού εκκρίματος 8 έως 12 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό. Επίσης, σε 8 από αυτές, παρατηρήθηκε αύξηση της θερμοκρασίας του σώματος (μέχρι $41,3\text{ }^{\circ}\text{C}$). Ωστόσο, μέχρι την ημέρα D2, όλα τα κλινικά συμπτώματα είχαν υποχωρήσει. Στα ετερόπλευρα ημιμόρια, δεν παρατηρήθηκε κανένα παθολογικό κλινικό εύρημα.

Εικόνα III.1. Υπερηχοτομογραφικά ευρήματα (επιμήκης τομή) σε θηλή του μαστού προβατίνας πριν και μετά τον ενοφθαλμισμό με *M. haemolytica*: (α) φυσιολογική απεικόνιση του θηλαίου κόλπου και των ιστών της θηλής, (β) έντονη ηχογένεια στο θηλαίο κόλπο, τα όρια του οποίου από τους παρακείμενους ιστούς είναι ασαφή, 18 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό.

(α)



(β)



Οκτώ (8) ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό διαπιστώθηκε παρουσία υπερηχογόνου υλικού (νιφάδες ή πήγματα γάλακτος) μέσα στο θηλαίο κόλπο, το οποίο απεικονίστηκε με σαφήνεια 18 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό (Εικόνα III.1β). Στη συνέχεια, η ποσότητα αυτού του υλικού αυξήθηκε και την ημέρα D1, παρατηρήθηκε πλέον και στο γαλακτοφόρο κόλπο. Προοδευτικά όμως, τα ευρήματα υποχώρησαν και μετά την ημέρα D3, δεν παρατηρήθηκε κανένα παθολογικό εύρημα. Στα ετερόπλευρα ημιμόρια, δεν παρατηρήθηκε κανένα παθολογικό εύρημα κατά την υπερηχοτομογραφική εξέταση.

Βακτηριολογικά και κυτταρολογικά ευρήματα μετά τον ενοφθαλμισμό

M. haemolytica απομονώθηκε σε καθαρή καλλιέργεια ως εξής: από 142 από τα 150 δείγματα υλικού θηλαίου πόρου, από 2 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό και μέχρι την ημέρα D5. Επίσης, απομονώθηκε από 54 από τα 150 δείγματα γάλακτος, 12 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό και μέχρι την ημέρα D4.

Από τα δείγματα υλικού θηλαίου πόρου και γάλακτος των μη ενοφθαλμισμένων ημιμορίων, δεν απομονώθηκαν βακτήρια.

Η στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς απομόνωσης του βακτηρίου μεταξύ ενοφθαλμισμένων - μη ενοφθαλμισμένων ημιμορίων για τα δείγματα υλικού θηλαίου πόρου ήταν $P \leq 0,02$ μέχρι και την ημέρα D2 και $P > 0,07$ στη συνέχεια. Αντίστοιχα, για τα δείγματα γάλακτος ήταν $P < 0,04$ από 12 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό μέχρι και την ημέρα D1 και $P > 0,07$ στα άλλα σημεία δειγματοληψίας.

Θετική αντίδραση (≥ 1) στη δοκιμή CMT παρατηρήθηκε σε 143 από τα 150 δείγματα γάλακτος από τα ενοφθαλμισμένα ημιμόρια. Στα επιχρίσματα γάλακτος παρατηρήθηκαν αρχικά (μέχρι την ημέρα D1), κυρίως ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα ($\geq 85\%$) και σε μικρότερο ποσοστό μακροφάγα και λεμφοκύτταρα (5-10%). Στη συνέχεια, το ποσοστό των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων μειώθηκε (40-50%) και αντίστοιχα αυξήθηκε αυτό των μακροφάγων και των λεμφοκυττάρων (5-20% και 10-40%, αντίστοιχα).

Σε όλα τα δείγματα γάλακτος από τα ετερόπλευρα ημιμόρια όλων των ζώων, παρατηρήθηκε αρνητική αντίδραση (< 1) στη δοκιμή CMT. Στα επιχρίσματα γάλακτος παρατηρήθηκαν περιστασιακά λίγα μακροφάγα.

Η στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς των αποτελεσμάτων της δοκιμής CMT στο γάλα μεταξύ ενοφθαλμισμένων - μη ενοφθαλμισμένων ημιμορίων ήταν $P \leq 0,04$ μέχρι και την ημέρα D3 και $P > 0,3$ στη συνέχεια.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους Πίνακες III.ii και III.iii.

Αιματολογικά ευρήματα μετά τον ενοφθαλμισμό

Ο αιματοκρίτης ήταν $33,7 \pm 0,7\%$ (μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση του μέσου όρου) από τον ενοφθαλμισμό μέχρι την ημέρα D1 και $33,7 \pm 1,6\%$ από την ημέρα D2 έως την ημέρα D5 ($P > 0,05$ σε σύγκριση με τις τιμές πριν τον ενοφθαλμισμό). Οι τιμές του αιματοκρίτη παρέμειναν εντός των φυσιολογικών ορίων (Aitken 2007, Roger 2008).

Ο αριθμός λευκοκυττάρων στο αίμα μειώθηκε 4 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό. Στη συνέχεια, αυξήθηκε σημαντικά μέχρι την ημέρα D1 και μετά, επανήλθε στις πριν από τον ενοφθαλμισμό τιμές. Η μέση τιμή του συνολικού αριθμού λευκοκυττάρων ήταν 8.951 ± 306 κύτταρα ανά μL αίματος έως και 8 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό, 10.933 ± 418 κύτταρα ανά μL αίματος από 12 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό έως και την ημέρα D1 και 9.197 ± 346 κύτταρα ανά μL αίματος στη συνέχεια. Οι αντίστοιχες τιμές για τα ώριμα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα ήταν 4.305 ± 188 , 5.066 ± 268 και 4.380 ± 272 κύτταρα ανά μL αίματος, για δε τα άωρα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα ήταν 252 ± 51 (ποσοστό 5,5% επί του συνολικού αριθμού ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων), 1.038 ± 82 (ποσοστό 17% επί του συνολικού αριθμού ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων) και 206 ± 56 (ποσοστό 4,5% επί του συνολικού αριθμού ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων) κύτταρα ανά μL αίματος.

Οι μεταβολές στον αριθμό λευκοκυττάρων μετά τον ενοφθαλμισμό ήταν στατιστικά σημαντικές σε σχέση με το χρόνο ($P = 0,01$). Αντίστοιχη στατιστική σημαντικότητα παρατηρήθηκε και για τις μεταβολές του αριθμού των άωρων ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων ($P < 0,001$) και των λεμφοκυττάρων ($P = 0,008$). Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε στατιστική σημαντικότητα για τις μεταβολές του αριθμού των ώριμων ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων και των μονοκυττάρων ($P > 0,1$).

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα III.iv και στην Εικόνα III.2.

Πίνακας III.ii. Βακτηριολογικά ευρήματα (απομόνωση *M. haemolytica*) και αποτελέσματα της δοκιμής CMT μετά τον ενοφθαλμισμό *M. haemolytica* στο θηλαίο πόρο προβατίνων.

	Χρονικό σημείο του πειραματισμού											
	Πριν τον ενοφθαλμισμό		Μετά τον ενοφθαλμισμό									
	D-2 ^α	D-1 ^α	2 h	4 h	8 h	12 h	18 h	D1 ^β	D2 ^β	D3 ^β	D4 ^β	D5 ^β
Απομόνωση <i>M. haemolytica</i>												
Υλικό θηλαίου πόρου	0/25	0/25	25/25	25/25	20/20	20/20	15/15	15/15	10/10	8/10	2/5	2/5
Γάλα	0/25	0/25	0/25	0/25	0/20	9/20	15/15	15/15	8/10	5/10	2/5	0/5
Αποτελέσματα δοκιμής CMT												
Θετική αντίδραση (≥"1")	0/25	0/25	19/25	25/25	20/20	20/20	15/15	15/15	10/10	10/10	5/5	4/5

α. D-2, D-1 = ημέρες πριν τον ενοφθαλμισμό.

β. D1, D2, κ.λπ. = ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως n/m=θετικά αποτελέσματα στο σύνολο των δειγμάτων που ελήφθησαν.

Πίνακας III.iii. Στατιστική σημαντικότητα ($P=$) μετά από προσαρμογή τύπου Bonferroni, των διαφορών των αποτελεσμάτων μεταξύ ενοφθαλμισμένων - μη ενοφθαλμισμένων ημιμορίων προβατίνων μετά τον ενοφθαλμισμό *M. haemolytica* στο θηλαίο πόρο τους.

	Χρονικό σημείο του πειραματισμού											
	Πριν τον ενοφθαλμισμό		Μετά τον ενοφθαλμισμό									
	D-2 ^α	D-1 ^α	2 h	4 h	8 h	12 h	18 h	D1 ^β	D2 ^β	D3 ^β	D4 ^β	D5 ^β
Απομόνωση <i>M. haemolytica</i> από υλικό θηλαίου πόρου	1,000	1,000	<0,001	<0,002	<0,003	<0,004	0,001	0,001	0,02	0,078	>0,5	>0,5
Απομόνωση <i>M. haemolytica</i> από γάλα	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,039	0,001	0,001	0,078	>0,5	>0,5	>0,5
Αποτελέσματα δοκιμής CMT	1,000	1,000	<0,001	<0,001	0,001	0,001	0,004	0,004	0,04	0,04	0,339	0,522
pH γάλακτος	1,000	1,000	0,282	<0,001	0,001	0,001	0,007	0,007	0,069	0,322	0,422	0,796
Περιεκτικότητα λίπους στο γάλα	0,675	0,532	-	-	-	-	-	<0,001	0,005	0,005	0,043	0,043
Περιεκτικότητα ολικών πρωτεϊνών στο γάλα	0,574	0,797	-	-	-	-	-	0,003	0,025	0,025	0,216	0,391
Περιεκτικότητα λακτόζης στο γάλα	0,914	0,450	-	-	-	-	-	0,004	0,025	0,026	0,216	0,216

α. D-2, D-1 = ημέρες πριν τον ενοφθαλμισμό.

β. D1, D2, κ.λπ. = ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό.

Πίνακας III.iv. Αιματολογικές παράμετροι (διάμεσες τιμές) σε προβατίνες μετά τον ενοφθαλμισμό *M. haemolytica* στο θηλαίο πόρο τους. Επισημαίνονται οι τύποι λευκοκυττάρων, όπου η μεταβολή ήταν στατιστικά σημαντική σε σχέση με το χρόνο ($P \leq 0,05$).

Παράμετρος	Χρονικό σημείο του πειραματισμού											
	Πριν τον ενοφθαλμισμό		Μετά τον ενοφθαλμισμό									
	D-2 ^α (n=25)	D-1 ^α (n=25)	2 h (n=25)	4 h (n=25)	8 h (n=20)	12 h (n=20)	18 h (n=15)	D1 ^β (n=15)	D2 ^β (n=10)	D3 ^β (n=10)	D4 ^β (n=5)	D5 ^β (n=5)
Αιματοκρίτης (%)	36,5	36	35	34	31	34	35	35	36	35	26	27
Λευκοκύτταρα (κύτταρα μL^{-1}) ^γ	9.150	8.700	8.900	7.750	9.500	10.250	11.950	11.800	9.200	8.175	10.150	9.500
Ώριμα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα (κύτταρα μL^{-1})	4.183	3.850	4.095	3.870	4.211	4.503	4.836	5.336	5.202	3.766	3.745	5.445
Άωρα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα (κύτταρα μL^{-1}) ^δ	0	0	0	0	433	826	1.161	1.375	267	107	102	0
Λεμφοκύτταρα (κύτταρα μL^{-1}) ^ε	2.820	2.538	3.060	2.655	2.762	2.808	3.119	3.643	2.548	2.945	2.940	3.600
Μονοκύτταρα (κύτταρα μL^{-1})	1.731	1.770	1.460	1.370	1.754	1.677	1.380	1.911	1.250	1.469	1.015	2.299

α. D-2, D-1 = ημέρες πριν τον ενοφθαλμισμό.

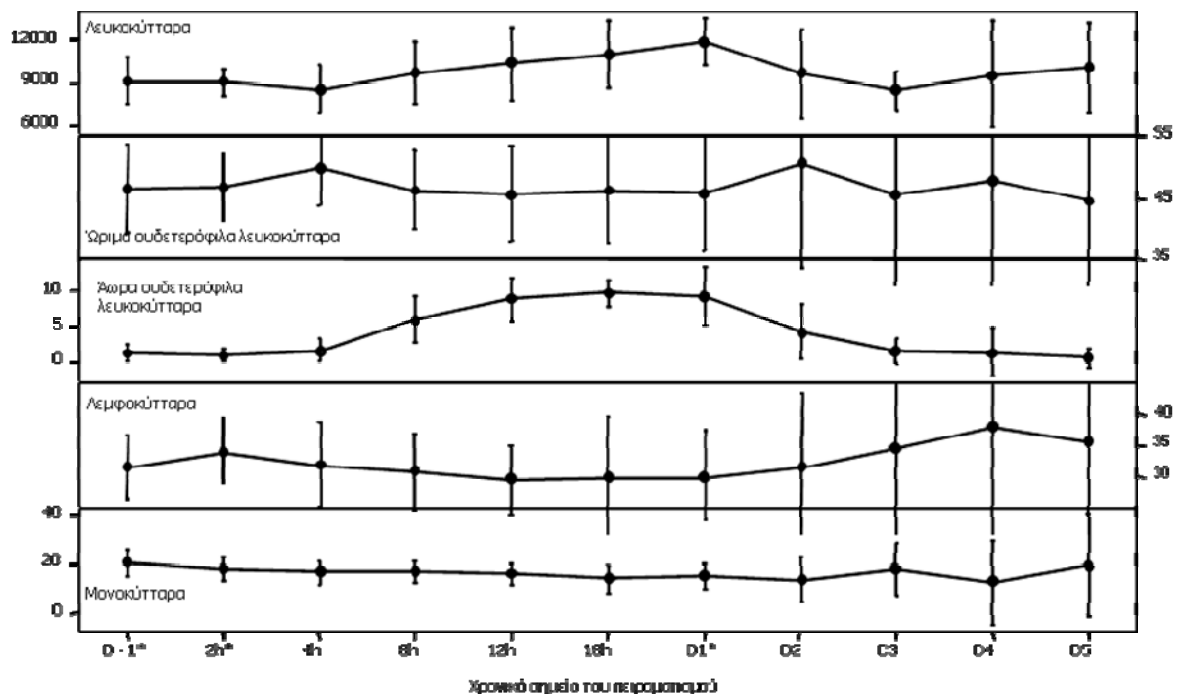
β. D1, D2, κ.λπ. = ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό.

γ. $P=0,01$ σε σχέση με το χρόνο κατά τη διάρκεια του πειραματισμού.

δ. $P<0,001$ σε σχέση με το χρόνο κατά τη διάρκεια του πειραματισμού.

ε. $P=0,008$ σε σχέση με το χρόνο κατά τη διάρκεια του πειραματισμού.

Εικόνα III.2. Αριθμός λευκοκυττάρων (μέσος όρος) ανά μL αίματος και αναλογίες των επί μέρους τύπων λευκοκυττάρων σε προβατίνες μετά τον ενοφθαλμισμό *M. haemolytica* στο θηλαίο πόρο τους.



* D-2, D-1 = ημέρες πριν τον ενοφθαλμισμό - 2h, 4h, κ.λπ. = ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό - D1, D2, κ.λπ. = ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό.

pH και σύνθεση του γάλακτος μετά τον ενοφθαλμισμό

Στα δείγματα γάλακτος από τα ενοφθαλμισμένα ημιμόρια, παρατηρήθηκε σαφής αύξηση του pH 8 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό. Οι τιμές του (διάμεση τιμή, διατεταρτημοριακό εύρος) ήταν 6,82 (0,32) μέχρι και 8 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό, 7,2 (0,60) από 12 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό μέχρι και την ημέρα D1 και 6,95 (0,43) στη συνέχεια. Οι αντίστοιχες τιμές για τα μη ενοφθαλμισμένα ημιμόρια ήταν 6,70 (0,16), 6,72 (0,13) και 6,73 (0,15).

Η στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς των τιμών του pH του γάλακτος μεταξύ ενοφθαλμισμένων και μη ενοφθαλμισμένων ημιμορίων ήταν $P < 0,01$ από 4 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό μέχρι και την ημέρα D1 και $P > 0,06$ στα άλλα σημεία δειγματοληψίας.

Στα δείγματα γάλακτος από τα ενοφθαλμισμένα ημιμόρια παρατηρήθηκε σαφής μείωση της περιεκτικότητας σε λίπος, ολικές πρωτεΐνες και λακτόζη. Επιπλέον, οι τιμές τους ήταν σημαντικά μικρότερες από εκείνες στο γάλα των ετερόπλευρων ημιμορίων.

Η διάμεση τιμή (διατεταρτημοριακό εύρος) της περιεκτικότητας σε λίπος ήταν 4,50% (0,95%) στο γάλα από τα ενοφθαλμισμένα ημιμόρια και 7,00% (0,55%) στο γάλα από τα μη ενοφθαλμισμένα ημιμόρια ($P<0,045$). Η διάμεση τιμή (διατεταρτημοριακό εύρος) της περιεκτικότητας σε ολικές πρωτεΐνες ήταν 5,00% (0,90%) στο γάλα από τα ενοφθαλμισμένα ημιμόρια και 5,65% (0,85%) στο γάλα από τα μη ενοφθαλμισμένα ημιμόρια ($P<0,03$ για τις διαφορές μέχρι και την ημέρα D3). Η διάμεση τιμή (διατεταρτημοριακό εύρος) της περιεκτικότητας σε λακτόζη ήταν 3,55% (1,05%) στο γάλα από τα ενοφθαλμισμένα ημιμόρια και 4,55% (0,45%) στο γάλα από τα μη ενοφθαλμισμένα ημιμόρια ($P<0,03$ για τις διαφορές μέχρι και την ημέρα D3).

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα III.iii και την Εικόνα III.3.

Παθολογοανατομικά ευρήματα

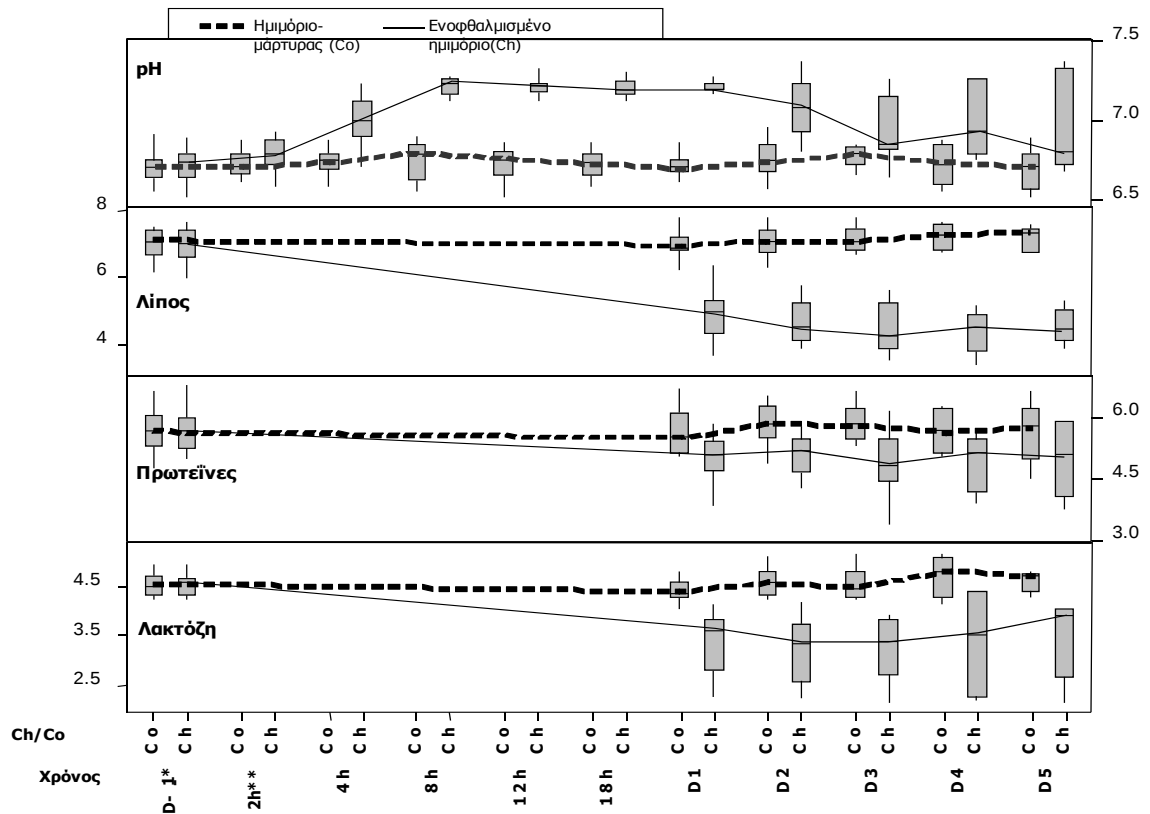
Βακτηριολογικά ευρήματα στα δείγματα ιστών

M. haemolytica απομονώθηκε σε καθαρή καλλιέργεια από 21 από τα 25 ξέσματα θηλαίου πόρου και από 16 από τα 25 ξέσματα θηλαίου κόλπου. Επίσης, απομονώθηκε από 10 από τα 25 δείγματα μαστικού παρεγχύματος και από 1 από τα 25 δείγματα μαστικού λεμφογαγγλίου από τα ενοφθαλμισμένα ημιμόρια. Δεν απομονώθηκε από κανένα δείγμα από τα μη ενοφθαλμισμένα ημιμόρια.

Η στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς απομόνωσης του βακτηρίου μεταξύ ενοφθαλμισμένων και μη ενοφθαλμισμένων ημιμορίων για τα ξέσματα θηλαίου πόρου ήταν $P=0,031$ μέχρι και την ημέρα D1 και $P>0,1$ στη συνέχεια. Για τα ξέσματα θηλαίου κόλπου και το μαστικό παρέγχυμα ήταν $P=0,031$ την ημέρα D1 και $P>0,1$ στα άλλα σημεία ευθανασίας. Για τα μαστικά λεμφογάγγλια ήταν $P>0,5$ σε όλα τα σημεία ευθανασίας.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα III.v.

Εικόνα III.3. pH και σύνθεση του γάλακτος προβατίνων μετά τον ενοφθαλμισμό *M. haemolytica* στο θηλαίο πόρο τους.



* Χρόνος: D-1 = ημέρα πριν τον ενοφθαλμισμό - 2h, 4h, κ.λπ. = ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό - D1, D2, κ.λπ. = ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό.

Πίνακας III.v. Βακτηριολογικά ευρήματα (απομόνωση *M. haemolytica*) σε δείγματα ιστών μετά τον ενοφθαλμισμό *M. haemolytica* στο θηλαίο πόρο προβατίνων.

Σημείο απομόνωσης (ενοφθαλμισμένο ημιμόριο)	Χρονικό σημείο του πειραματισμού				
	4 h	12 h	D1 ^α	D3 ^α	D5 ^α
Θηλαίος πόρος	5/5	5/5	5/5	3/5	3/5
Θηλαίος κόλπος	1/5	4/5	5/5	4/5	2/5
Μαστικό παρέγχυμα	0/5	1/5	5/5	3/5	1/5
Μαστικά λεμφογαγγλία	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5

α. D1, D3, κ.λπ. = ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως n/m=θετικά αποτελέσματα στο σύνολο των δειγμάτων που ελήφθησαν.

Μακροσκοπικά νεκροτομικά και ιστοπαθολογικά ευρήματα

Από τη σύγκριση του μήκους του αυλού της θηλής με το μήκος του χρησιμοποιούμενου για τον ενοφθαλμισμό καθετήρα, επιβεβαιώθηκε ότι το ενοφθάλμισμα είχε τοποθετηθεί στο θηλαίο πόρο.

Η εσωτερική επιφάνεια της θηλής ήταν ανώμαλη, είχε πτυχώσεις και παρουσίαζε υπεραιμία και πετέχειες στο θηλαίο κόλπο. Το κύριο ιστοπαθολογικό εύρημα ήταν η έντονη λευκοκυτταρική διήθηση του επιθηλίου, η οποία ήταν αυξημένη στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου, καθώς και στο θηλαίο κόλπο. Παρατηρήθηκαν ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα, λεμφοκύτταρα και πλασμοκύτταρα. Παρατηρήθηκαν επίσης συναθροίσεις λεμφοκυττάρων με εικόνα χαρακτηριστική θυλακίου, με ή χωρίς ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα και βλαστική δραστηριότητα, στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου (Εικόνα III.4).

Στο μαστικό παρέγχυμα των ζώων δεν παρατηρήθηκαν μακροσκοπικά νεκροτομικά παθολογικά ευρήματα. Ιστολογικά, παρατηρήθηκαν λευκοκυτταρική διήθηση (ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα, λεμφοκύτταρα), ρήξη αγγείων και αποδιοργάνωση της αρχιτεκτονικής των επιθηλιακών κυττάρων των αδενοκυψελών του μαστικού αδένος.

Τα αποτελέσματα της εκτίμησης της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων στα ενοφθαλμισμένα ημιμόρια παρουσιάζονται στον Πίνακα III.vi. Η τιμή της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων στα μη ενοφθαλμισμένα ημιμόρια κυμαινόταν από 0 έως 2 (μέγιστη δυνατή τιμή: 16).

Η βαρύτητα των παθολογοανατομικών ευρημάτων στη θηλή ήταν σημαντικά μεγαλύτερη για τα ενοφθαλμισμένα ημιμόρια σε σχέση με τα μη ενοφθαλμισμένα ημιμόρια. Η στατιστική σημαντικότητα αυτής της διαφοράς κυμαινόταν για μεν τα μακροσκοπικά νεκροτομικά ευρήματα από $P=0,025$ έως $P=0,046$, για δε τα ιστοπαθολογικά ευρήματα από $P=0,039$ έως $P=0,042$. Αντίθετα, η βαρύτητα των παθολογοανατομικών ευρημάτων στο μαστικό παρέγχυμα δεν ήταν σημαντικά διαφορετική μεταξύ ενοφθαλμισμένων ημιμορίων και ημιμορίων-μαρτύρων. Η στατιστική σημαντικότητα αυτής της διαφοράς για τα μακροσκοπικά νεκροτομικά ευρήματα και για τα ιστοπαθολογικά ευρήματα ήταν $P>0,1$.

Πίνακας III.vi. Τιμές^α της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων στα ενοφθαλμισμένα ημιμόρια του μαστού προβατίνων μετά τον ενοφθαλμισμό *M. haemolytica* στο θηλαίο πόρο τους.

	Χρονικό σημείο του πειραματισμού				
	4 h (n=5)	12 h (n=5)	D1 ^β (n=5)	D3 ^β (n=5)	D5 ^β (n=5)
Θηλή ^γ	2* (2-3)	3* (3-4)	4* (3-5)	5* (3-6)	6* (4-6)
Μαστικό παρέγχυμα ^γ	0 (0-1)	0 (0-1)	1 (1-3)	2 (0-2)	2 (2-3)
Συνολική τιμή ^δ	2* (2-3)	4* (3-4)	5* (5-6)	7* (3-7)	8* (6-9)

α. Διάμεσες τιμές (διακύμανση).

β. D1, D3, κ.λπ. = ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό.

γ. Μέγιστη δυνατή τιμή: 8 (περιλαμβάνονται μακροσκοπικά νεκροτομικά και ιστοπαθολογικά ευρήματα).

δ. Μέγιστη δυνατή τιμή: 16.

* $P < 0,05$, σε σύγκριση με τα μη ενοφθαλμισμένα ημιμόρια.

Ανοσοϊστοχημικά ευρήματα

Ανοσοϊστοχημικά ευρήματα στις θηλές

Σε όλα τα δείγματα από τις 10 ενοφθαλμισμένες θηλές που εξετάστηκαν, ανιχνεύθηκαν B-λεμφοκύτταρα (CD79⁺), T-λεμφοκύτταρα (CD3⁺), γδ-T-λεμφοκύτταρα (γδ⁺) και παράγοντες του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας 2ης τάξης (MHC-II⁺). Αυτά παρατηρήθηκαν εντός της περιοχής συνάθροισης λεμφοκυττάρων στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου (Εικόνα III.4), καθώς και σε άλλα σημεία του επιθηλίου της θηλής (Εικόνα III.5).

Στις θηλές, διαπιστώθηκε επίσης η παρουσία μακροφάγων (CD68⁺). Επιπλέον, παρατηρήθηκε διαφορά στον αριθμό των T-κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων (CD8⁺) μεταξύ της ημέρας D3 (διάμεσος τιμή: 0) και της ημέρας D5 (διάμεσος τιμή: 2). Σε καμία θηλή δεν ανιχνεύθηκαν T-βοηθητικά λεμφοκύτταρα (CD4⁺).

Η στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς του αριθμού των T-κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων μεταξύ της ημέρας D3 και της ημέρας D5 ήταν $P=0,005$. Η στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς του αριθμού των άλλων τύπων κυττάρων μεταξύ της ημέρας D3 και της ημέρας D5 ήταν $P>0,125$.

Τα αποτελέσματα της εκτίμησης των ανοσοϊστοχημικών ευρημάτων στις θηλές παρουσιάζονται στον Πίνακα III.vii και στις Εικόνες III.4 και III.5.

Πίνακας III.vii. Τιμές^α της εκτίμησης των ανοσοϊστοχημικών ευρημάτων σε θηλές του μαστού προβατίνων μετά τον ενοφθαλμισμό *M. haemolytica* στο σύστοιχο θηλαίο πόρο τους.

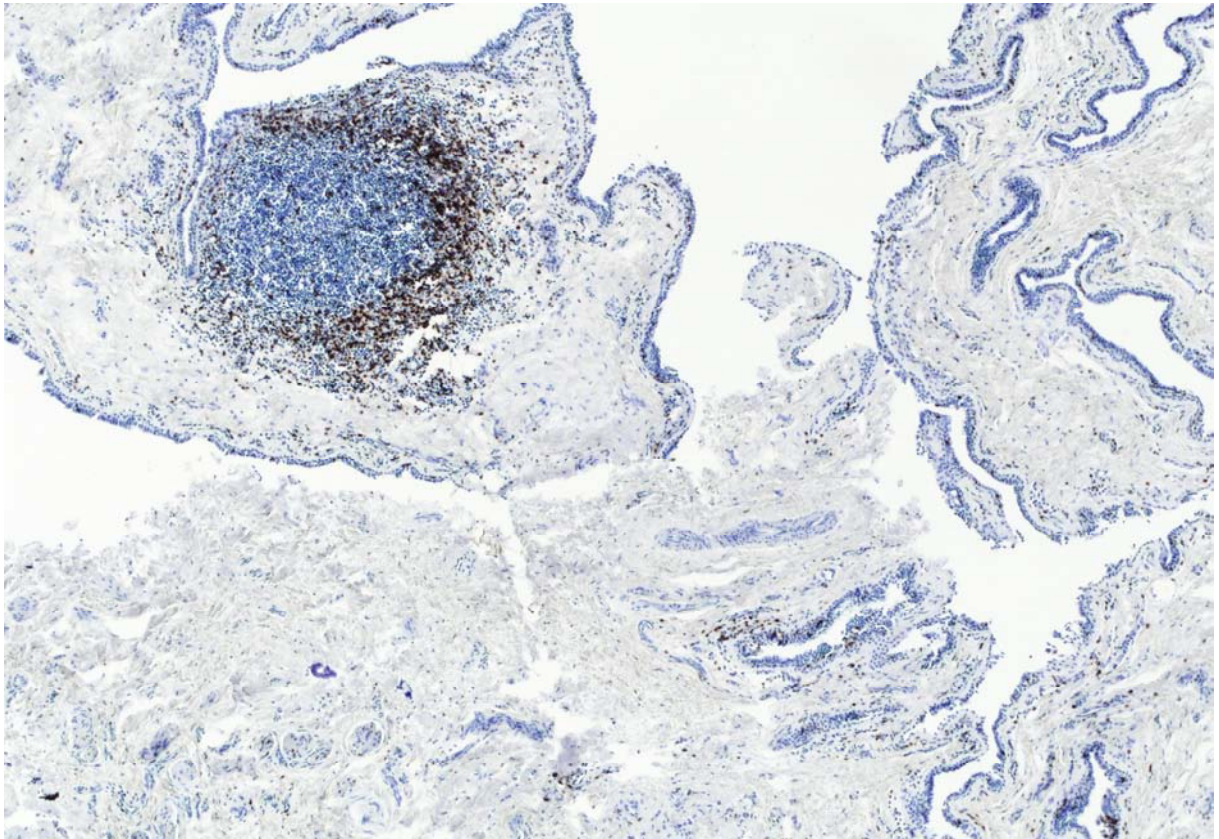
Τύπος κυττάρων	Χρονικό σημείο του πειραματισμού	
	D3 ^β (n=5)	D5 ^β (n=5)
B-λεμφοκύτταρα (CD79 ⁺)	2 (2-3)	2 (2-3)
T-λεμφοκύτταρα (CD3 ⁺)	2 (2-3)	3 (3-3)
γδ-T-λεμφοκύτταρα (γδ ⁺)	2 (2-2)	2 (2-2)
T-βοηθητικά λεμφοκύτταρα (CD4 ⁺)	0 (0-0)	0 (0-0)
T-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα (CD8 ⁺) ^γ	0 (0-1)	2 (2-3)
Μακροφάγα (CD68 ⁺)	1 (0-1)	1 (0-1)
Παράγοντες μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας 2ης τάξης (MHC-II ⁺)	3 (2-3)	3 (2-3)

α. Διάμεσες τιμές (διακύμανση), μέγιστη δυνατή τιμή: 4.

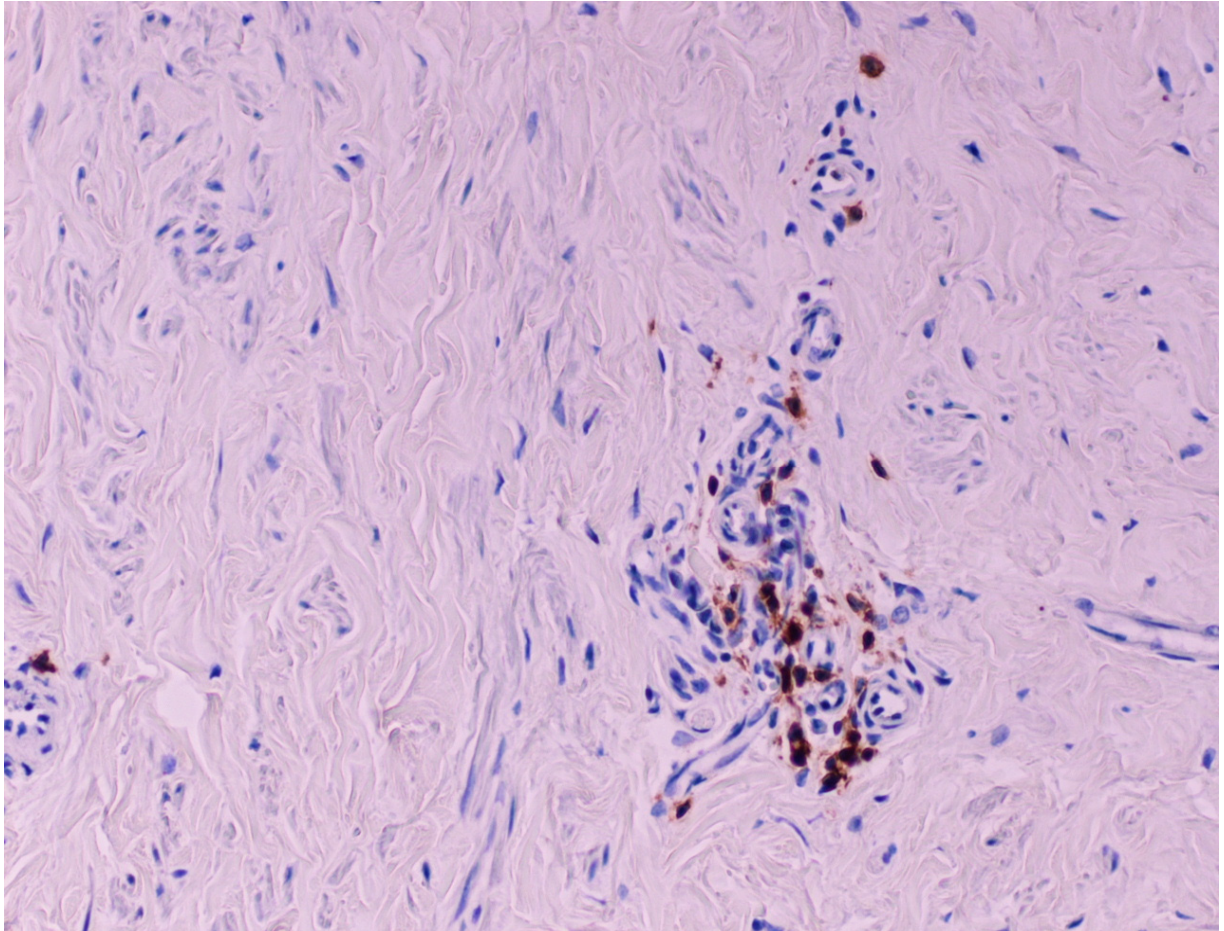
β. D3, D5 = ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό.

γ. $P < 0,05$ μεταξύ των χρονικών σημείων του πειραματισμού.

Εικόνα III.4. Έντονου βαθμού σήμανση Τ-λεμφοκυττάρων (CD3⁺) στην περιφέρεια ενός θηλακίου λεμφοκυττάρων στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου προβατίνας, 5 ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό *M. haemolytica* στο θηλαίο πόρο (×40).



Εικόνα III.5. Μικρού βαθμού σήμανση Τ-λεμφοκυττάρων (CD3⁺) εντός του συνδετικού ιστού του ερειστικού στρώματος του θηλαίου πόρου προβατίνας, 5 ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό *M. haemolytica* στο θηλαίο πόρο (×200).



Ανοσοϊστοχημικά ευρήματα στα μαστικά λεμφογάγγλια

Για όλους τους τύπους κυττάρων και για κάθε ανατομική ζώνη, η τιμή της εκτίμησης των ανοσοϊστοχημικών ευρημάτων στα μαστικά λεμφογάγγλια ήταν μεγαλύτερη για τα ενοφθαλμισμένα ημιμόρια απ' ό,τι για τα ετερόπλευρα (μη ενοφθαλμισμένα) ημιμόρια. Οι τιμές της εκτίμησης των ανοσοϊστοχημικών ευρημάτων στις επί μέρους ανατομικές ζώνες των μαστικών λεμφογαγγλίων παρουσιάζονται στον Πίνακα III.viii.

Πίνακας III.viii. Τιμές^a της εκτίμησης των ανοσοϊστοχημικών ευρημάτων στις ανατομικές ζώνες των μαστικών λεμφογαγγλίων προβατίνων μετά τον ενοφθαλμισμό *M. haemolytica* στο σύστοιχο θηλαίο πόρο.

Τύπος κυττάρων	Ανατομική ζώνη λεμφογαγγλίου				
	Πρωτογενή θυλάκια	Δευτερογενή θυλάκια		Παραφλοι- ώδης μοίρα	Μυελώδης μοίρα
		περιφερική ζώνη	κεντρική ζώνη		
B-λεμφοκύτταρα (CD79 ⁺)	2,48 (2)	1,16 (1)	2,20 (2)	0,60 (1)	1,16 (1)
T-λεμφοκύτταρα (CD3 ⁺)	2,20 (2)	2,68 (3)	2,04 (2)	4,08 (4)	3,72 (4)
γδ-T-λεμφοκύτταρα (γδ ⁺)	3,40 (3)	2,40 (3)	0,08 (0)	2,80 (3)	3,40 (3)
T-βοηθητικά λεμφοκύτταρα (CD4 ⁺)	2,44 (2)	2,24 (3)	1,64 (2)	3,48 (4)	2,32 (2)
T-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα (CD8 ⁺)	0,68 (1)	0,28 (0)	0,16 (0)	0,72 (0)	0,68 (0)
Μακροφάγα (CD68 ⁺)	1,28 (1)	0,40 (0)	0,96 (1)	1,32 (1)	1,84 (2)
Παράγοντες μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας 2ης τάξης (MHC-II ⁺)	2,60 (3)	2,00 (1)	1,32 (3)	2,48 (2)	1,72 (2)

α. Μέση (διάμεσος) τιμή για 25 προβατίνες, μέγιστη δυνατή τιμή: 4.

Η στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς στην τελική τιμή των ανοσοϊστοχημικών ευρημάτων των μαστικών λεμφογαγγλίων (άθροισμα των αποτελεσμάτων των πέντε ανατομικών περιοχών κάθε λεμφογαγγλίου) μεταξύ των ενοφθαλμισμένων και των μη ενοφθαλμισμένων ημιμορίων ήταν $P=0,005$ για τα B-λεμφοκύτταρα (CD79⁺), $P=0,585$ για τα T-λεμφοκύτταρα (CD3⁺), $P=0,099$ για τα γδ-T-λεμφοκύτταρα (γδ⁺), $P=0,004$ για τα T-βοηθητικά λεμφοκύτταρα (CD4⁺), $P=0,337$ για τα T-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα (CD8⁺), $P<0,001$ για τα μακροφάγα (CD68⁺) και $P=0,063$ για τους παράγοντες μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας 2ης τάξης (MHC-II⁺).

Για όλους τους τύπους κυττάρων, υπήρχαν διαφορές στην τελική τιμή των ανοσοϊστοχημικών ευρημάτων μεταξύ των χρονικών σημείων του πειραματισμού (Πίνακας III.ix). Η στατιστική σημαντικότητα των διαφορών αυτών ήταν: $P=0,01$ για τα B-λεμφοκύτταρα (CD79⁺), $P=0,052$ για τα T-λεμφοκύτταρα (CD3⁺), $P=0,149$ για τα γδ-T-λεμφοκύτταρα (γδ⁺), $P=0,05$ για τα T-βοηθητικά λεμφοκύτταρα (CD4⁺), $P=0,882$ για τα T-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα (CD8⁺), $P<0,001$ για τα μακροφάγα (CD68⁺) και $P=0,648$ για τους παράγοντες μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας 2ης τάξης (MHC-II⁺).

Πίνακας III.ix. Τιμές^α των ανοσοϊστοχημικών ευρημάτων στα μαστικά λεμφογάγγλια των ενοφθαλμισμένων ημιμορίων προβατίνων μετά τον ενοφθαλμισμό *M. haemolytica* στο σύστοιχο θηλαίο πόρο.

Τύπος κυττάρων	Χρονικό σημείο του πειραματισμού				
	4 h (n=5)	12 h (n=5)	D1 ^β (n=5)	D3 ^β (n=5)	D5 ^β (n=5)
B-λεμφοκύτταρα (CD79 ⁺) ^γ	4	4	10	10	10
T-λεμφοκύτταρα (CD3 ⁺)	15	14	15	15	15
γδ-T-λεμφοκύτταρα (γδ ⁺)	13	12	12	11	12
T-βοηθητικά λεμφοκύτταρα (CD4 ⁺) ^γ	8	12	12	14	15
T-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα (CD8 ⁺)	5	5	1	1	4
Μακροφάγα (CD68 ⁺) ^γ	0	5	6	8	10
Παράγοντες μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας 2ης τάξης (MHC-II ⁺)	10	10	11	10	10

α. Διάμεση τιμή για 5 προβατίνες, μέγιστη δυνατή τιμή: 20.

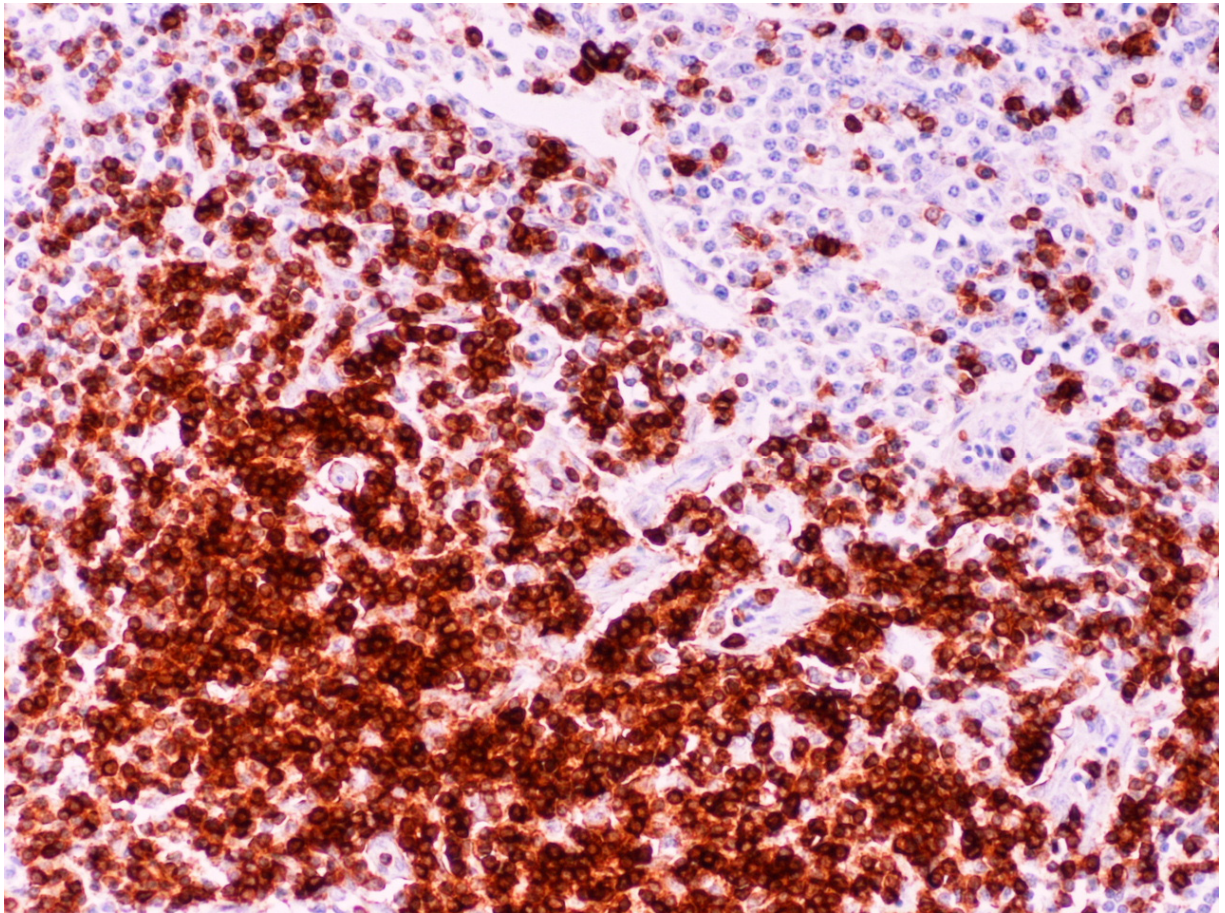
β. D1, D3, D5 = ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό.

γ. $P < 0,05$ μεταξύ των χρονικών σημείων του πειραματισμού.

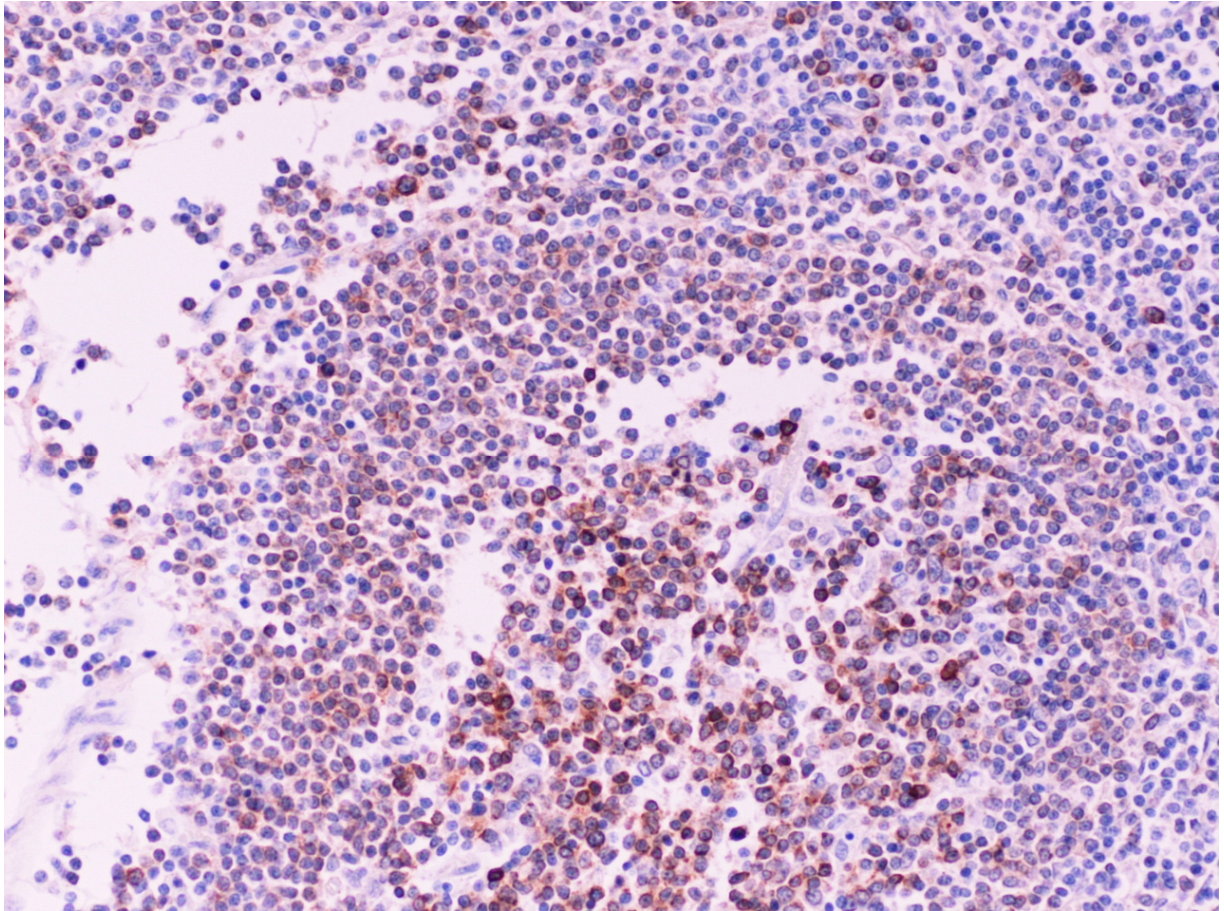
Τα T-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα (CD8⁺) ήταν τα κύτταρα με το μικρότερο αριθμό στα δείγματα των μαστικών λεμφογαγγλίων. Συγκεκριμένα, η μέση τελική τιμή τους για όλα τα χρονικά σημεία του πειραματισμού ήταν σημαντικά μικρότερη από την αντίστοιχη των άλλων κυττάρων. Η στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς μεταξύ αυτών των κυττάρων και όλων των άλλων τύπων κυττάρων ήταν $P < 0,003$.

Τα αποτελέσματα της σήμανσης των κυττάρων στα μαστικά λεμφογάγγλια παρουσιάζονται στις Εικόνες III.6, III.7, III.8, III.9 και III.10.

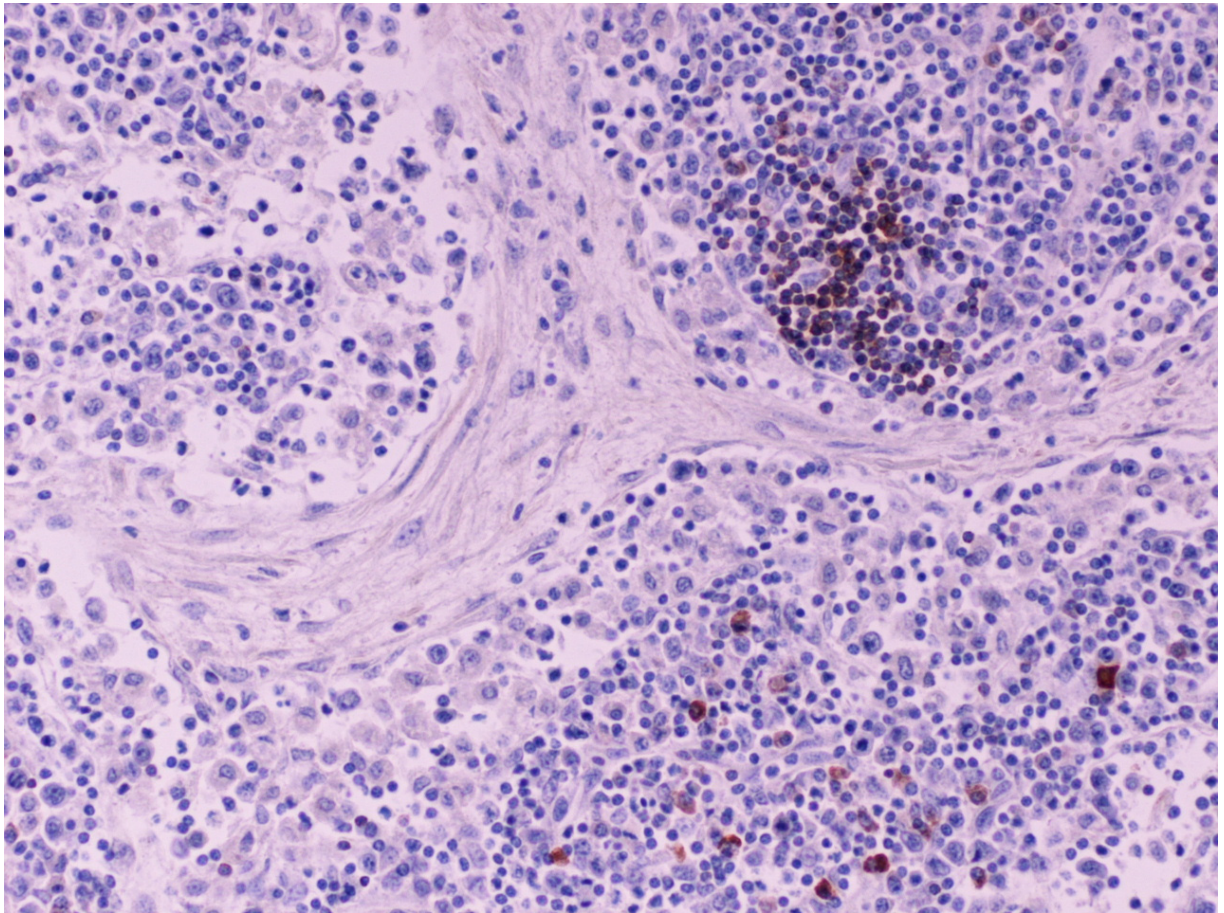
Εικόνα III.6. Ιδιαίτερα έντονου βαθμού σήμανση Τ-λεμφοκυττάρων (CD3⁺) του λεμφοζιδίου της παραφλοιώδους μοίρας του μαστικού λεμφογαγγλίου προβατίνας, 5 ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό *M. haemolytica* στο σύστοιχο θηλαίο πόρο (×200).



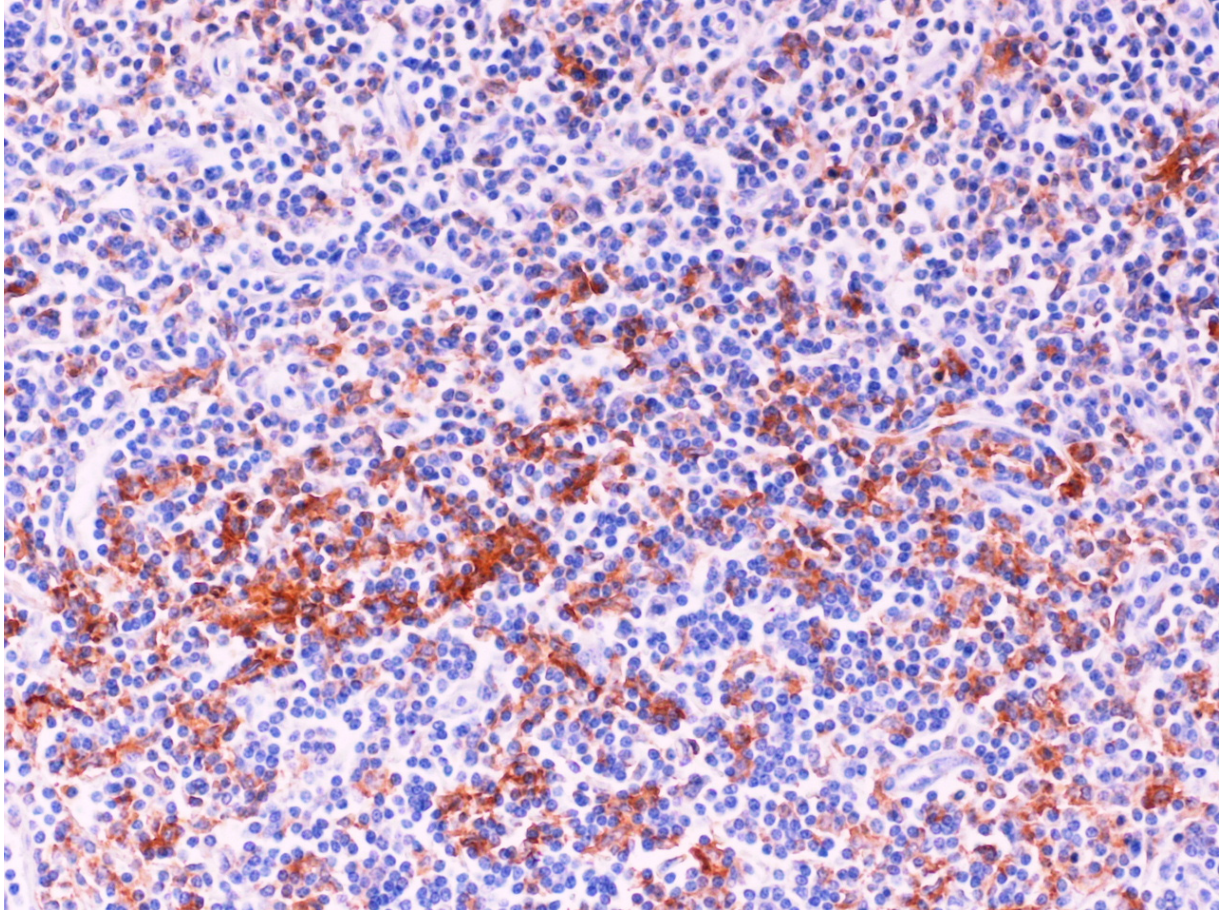
Εικόνα III.7. Έντονου βαθμού σήμανση B-λεμφοκυττάρων (CD79⁺) στο βλαστικό κέντρο λεμφοζιδίου της φλοιώδους μοίρας του μαστικού λεμφογαγγλίου προβατίνας, 5 ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό *M. haemolytica* στο σύστοιχο θηλαίο πόρο (×200).



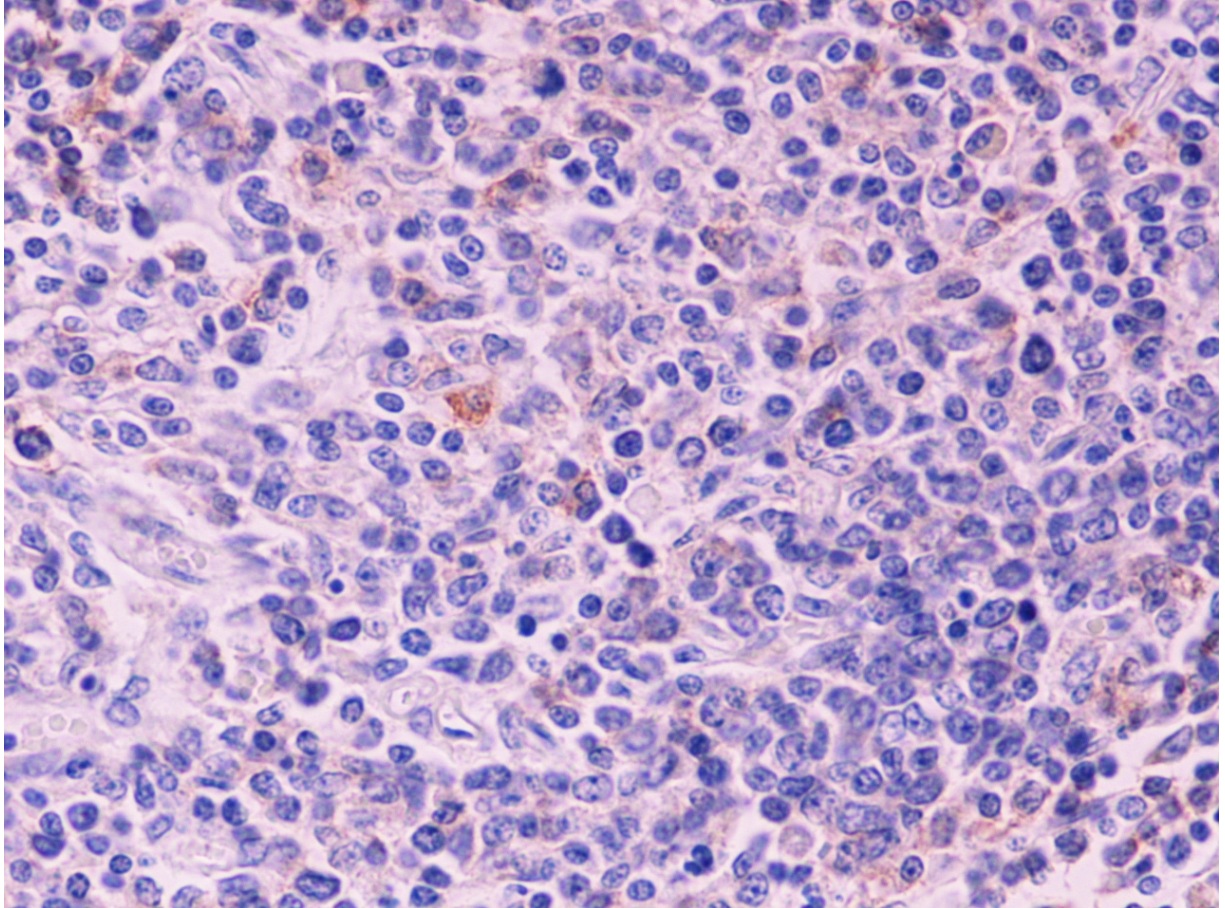
Εικόνα III.8. Μικρού βαθμού σήμανση B-λεμφοκυττάρων (CD79⁺) στο μαστικό λεμφογάγγλιο προβατίνας, 5 ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό *M. haemolytica* στο σύστοιχο θηλαίο πόρο (×200).



Εικόνα III.9. Μέτριου βαθμού σήμανση κυττάρων (B-λεμφοκύτταρα, δένδριτικά κύτταρα) (MHC-II⁺) στο βλαστικό κέντρο λεμφοζιδίου της φλοιώδους μοίρας του μαστικού λεμφογαγγλίου προβατίνας, 5 ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό *M. haemolytica* στο σύστοιχο θηλαίο πόρο (×200).



Εικόνα III.10. Μικρού βαθμού σήμανση κυττάρων (μακροφάγα, δένδριτικά κύτταρα) (MHC-II⁺) στο βλαστικό κέντρο λεμφοζιδίου της φλοιώδους μοίρας του μαστικού λεμφογαγγλίου προβατίνας, 5 ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό *M. haemolytica* στο σύστοιχο θηλαίο πόρο (×400).



Γ. ΣΥΝΕΠΕΙΕΣ ΤΟΥ ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΟΥ ΕΝΟΣ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ MANNHEIMIA HAEMOLYTICA ΑΠΟ ΑΝΩΤΕΡΗ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗ ΟΔΟ ΑΡΝΙΟΥ, ΣΤΗ ΘΗΛΗ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΤΩΝ ΠΡΟΒΑΤΩΝ

Υλικά και μέθοδοι

Πειραματικός σχεδιασμός

Ο πειραματισμός πραγματοποιήθηκε μετά από εξασφάλιση σχετικής άδειας από τη Διεύθυνση Κτηνιατρικής της Νομαρχιακής Αυτοδιοίκησης Καρδίτσας. Σε αυτόν χρησιμοποιήθηκαν 36 πρωτοτόκες προβατίνες Καραγκούνικης φυλής, κατά τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου. Τα ζώα προέρχονταν από εκτροφή της περιοχής Καρδίτσας. Η διαχείριση των ζώων κατά τη διάρκεια του πειραματισμού, ήταν όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο II, Τμήμα Β).

Τα αρνιά τους απογαλακτίστηκαν τη 18η ημέρα μετά τον τοκετό. Στη συνέχεια, τα πειραματόζωα αρμέγονταν, πάντοτε από το ίδιο άτομο, τρεις φορές καθημερινά. Τα ζώα χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες (Α, Β ή Γ, n=12) και έγινε ενοφθαλμισμός τους δύο ημέρες αργότερα (20ή ημέρα της γαλακτικής περιόδου).

Μία θηλή του μαστού κάθε ζώου της ομάδας Α ενοφθαλμίστηκε με 1.250 cfu (διακύμανση: 1.210-1.275 cfu) *M. haemolytica*. Μία θηλή κάθε ζώου της ομάδας Β ενοφθαλμίστηκε με 1.250 cfu (διακύμανση: 1.220-1.285 cfu) *M. haemolytica*, αφού προηγουμένως είχαν προκληθεί στο δέρμα της θηλής του μαστού αλλοιώσεις, μετά από εμβάπτισή της σε διάλυμα καυστικού νατρίου (Κεφάλαιο II, Τμήμα Β). Η βαρύτητα των αλλοιώσεων βαθμολογήθηκε με "2" έως "3" στην κλίμακα των Fox και συν. (1991) (Πίνακας II.i). Τέλος, ένας μαστικός αδένας κάθε ζώου της ομάδας Γ ενοφθαλμίστηκε με 1.250 cfu (διακύμανση: 1.235-1.290 cfu) *M. haemolytica*.

Κάθε ομάδα χωρίστηκε σε τέσσερις υποομάδες (υποομάδα 1: n=4, υποομάδα 2: n=4, υποομάδα 3: n=2, υποομάδα 4: n=2). Τα ζώα κάθε υποομάδας ενοφθαλμίστηκαν με διαφορετικό στελέχος *M. haemolytica*, όπως συνοψίζεται στον Πίνακα III.x.

Πίνακας III.x. Περιληπτική παρουσίαση του πειραματικού σχεδιασμού για αξιολόγηση της παθογόνου δράσης τεσσάρων διαφορετικών στελεχών *M. haemolytica* στο μαστό προβατίνων.

Υποομάδα	Στέλεχος <i>M. haemolytica</i> , που χρησιμοποιήθηκε	Σημείο ενοφθαλμισμού	Χρονικά σημεία ευθανασίας μετά τον ενοφθαλμισμό ^α
A1 (n=4)	DAG21T	Θηλαίος πόρος κλινικά υγιούς θηλής	D2 ^β (×2) ^γ , D4 ^β (×2)
A2 (n=4)	DAG21R		D2 (×2), D4 (×2)
A3 (n=2)	VSM08L		D2, D4
A4 (n=2)	ES26L		D2, D4
B1 (n=4)	DAG21T	Θηλαίος πόρος θηλής με αλλοιώσεις	D2 (×2), D4 (×2)
B2 (n=4)	DAG21R		D2 (×2), D4 (×2)
B3 (n=2)	VSM08L		D2, D4
B4 (n=2)	ES26L		D2, D4
Γ1 (n=4)	DAG21T	Γαλακτοφόρος κόλπος	D2 (×2), D4 (×2)
Γ2 (n=4)	DAG21R		D2 (×2), D4 (×2)
Γ3 (n=2)	VSM08L		D2, D4
Γ4 (n=2)	ES26L		D2, D4

α. ενοφθαλμισμός την ημέρα D0.

β. D2, D4 = ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό.

γ. (×2) = δύο ζώα σε κάθε σημείο ευθανασίας.

Το στέλεχος DAG21T είχε απομονωθεί από το θηλαίο πόρο μιας υγιούς προβατίνας. Το στέλεχος DAG21R είχε απομονωθεί από την ανώτερη αναπνευστική οδό του κλινικά υγιούς αρνιού της. Οι συνθήκες και η διαδικασία απομόνωσης αυτών των στελεχών δεν αποτελούν τμήμα της παρούσας διατριβής. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν δύο ακόμη στελέχη *M. haemolytica* με τεκμηριωμένη παθογόνο δράση για το μαστικό αδένα των προβατίνων: το στέλεχος VSM08L και το στέλεχος ES26L, το οποίο είχε απομονωθεί από περιστατικό οξείας κλινικής μαστίτιδας προβατίνας στην Αγγλία (El-Masannat και συν. 1991) και χρησιμοποιήθηκε μετά από άδεια του ομότιμου καθηγητή J.E.T Jones.

Η προετοιμασία των ζώων για τον ενοφθαλμισμό, η προετοιμασία των στελεχών *M. haemolytica* και η διαδικασία ενοφθαλμισμού έχουν περιγραφεί παραπάνω (Τμήμα Β).

Εξετάσεις πριν και μετά τον ενοφθαλμισμό

Πραγματοποιούνταν κλινική εξέταση των ζώων και λαμβάνονταν δείγματα υλικού θηλαίου πόρου και γάλακτος για βακτηριολογική και κυτταρολογική εξέταση, όπως περιγράφηκε παραπάνω (Τμήμα Β). Επίσης, έγινε παθολογοανατομική εξέταση (μακροσκοπική νεκροτομική και ιστοπαθολογική εξέταση) μετά από ευθανασία των ζώων, όπως περιγράφηκε παραπάνω (Τμήμα Β), στα χρονικά σημεία που αναφέρονται στον Πίνακα ΙΙΙ.χ.

Υπολογισμοί και στατιστική ανάλυση

Για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων του ενοφθαλμισμού από τα διάφορα στελέχη *M. haemolytica*, χρησιμοποιήθηκε η δοκιμή χ^2 . Για την εκτίμηση της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων χρησιμοποιήθηκε το σύστημα αξιολόγησης που περιγράφηκε παραπάνω (Τμήμα Β).

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα Minitab 15 (Minitab Inc., State College, PA, ΗΠΑ) και Stata-9 (Stata Corporation LP, College Station, TX, ΗΠΑ).

Κατά τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η τιμή $P < 0,05$ για τον ορισμό της στατιστικής σημαντικότητας.

Αποτελέσματα

Ευρήματα πριν τον ενοφθαλμισμό

Όλες οι προβατίνες ήταν κλινικά υγιείς από τον τοκετό μέχρι την έναρξη του πειραματισμού. Οι θηλές του μαστού τους ήταν μαλακές, χωρίς αλλοιώσεις.

Δεν απομονώθηκαν βακτήρια από το υλικό του θηλαίου πόρου και από το γάλα. Η αντίδραση της δοκιμής CMT ήταν αρνητική ($< 1''$) σε όλα τα δείγματα. Στα επιχρίσματα γάλακτος δεν παρατηρήθηκαν λευκοκύτταρα.

Μετά την πρόκληση αλλοιώσεων στις θηλές των ζώων της ομάδας Β, η αντίδραση της δοκιμής CMT ήταν θετική ($1''$). Στα επιχρίσματα γάλακτος παρατηρήθηκαν κυρίως (80%-90%) ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα, καθώς και ένα μικρότερο ποσοστό (10-20%) μακροφάγων.

Κλινικά, βακτηριολογικά και κυτταρολογικά ευρήματα μετά τον ενοφθαλμισμό

Ενοφθαλμισμένα ημιμόρια

Οι προβατίνες της ομάδας Α εκδήλωσαν ήπια, παροδικά κλινικά συμπτώματα που περιορίζονταν στη θηλή του μαστού. *M. haemolytica* απομονώθηκε σε καθαρή καλλιέργεια από 38 από τα 72 δείγματα υλικού θηλαίου πόρου και γάλακτος. Θετική αντίδραση (≥ 1) στη δοκιμή CMT παρατηρήθηκε σε 24 από τα 36 δείγματα γάλακτος.

Οι προβατίνες της ομάδας Β και της ομάδας Γ παρουσίασαν γενικά κλινικά συμπτώματα (πυρετός έως 40,6 °C, ανορεξία, κατάπτωση, χλωρότητα) και εκδήλωσαν κλινική μαστίτιδα (μαστικό έκκριμα ορώδες με πύγματα ή νιφάδες, αυξημένη θερμοκρασία και αυξημένο μέγεθος του μαστικού αδένα, ερυθρότητα του δέρματος του μαστού, σκληρότητα του παρεγχύματος, πόνος κατά την ψηλάφηση και δυσκολία στην άρμεξη) εντός 24 ωρών μετά τον ενοφθαλμισμό. *M. haemolytica* απομονώθηκε σε καθαρή καλλιέργεια από όλα τα δείγματα υλικού θηλαίου πόρου και μαστικού εκκρίματος (72 από τα 72) από τα ζώα της ομάδας Β. Επίσης, απομονώθηκε από 37 από τα 72 δείγματα από τα ζώα της ομάδας Γ. Θετική αντίδραση (≥ 1) στη δοκιμή CMT παρατηρήθηκε σε όλα τα δείγματα μαστικού εκκρίματος (36 από τα 36) από τα ζώα της ομάδας Β και της ομάδας Γ.

Στα επιχρίσματα μαστικού εκκρίματος (ομάδες Α, Β και Γ) παρατηρήθηκαν λευκοκύτταρα. Αρχικά (μέχρι την ημέρα D3), τα περισσότερα (>75%) ήταν ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα, ενώ, σε μικρότερο ποσοστό, παρατηρήθηκαν μακροφάγα και λεμφοκύτταρα. Στη συνέχεια, το ποσοστό των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων μειώθηκε (50-75%), ενώ αυξήθηκε αυτό των μακροφάγων και των λεμφοκυττάρων (5-15% και 5-35%, αντίστοιχα).

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα III.xi.

Μη ενοφθαλμισμένα ημιμόρια

Στα ετερόπλευρα ημιμόρια των ζώων των ομάδων Α και Γ, δεν παρατηρήθηκε κανένα παθολογικό κλινικό εύρημα. Από τα δείγματα υλικού θηλαίου πόρου και γάλακτος, δεν απομονώθηκαν βακτήρια. Σε όλα τα δείγματα γάλακτος, παρατηρήθηκε αρνητική αντίδραση (< 1) στη δοκιμή CMT. Στα επιχρίσματα γάλακτος παρατηρήθηκαν περιστασιακά λίγα μακροφάγα.

Στις ετερόπλευρες θηλές του μαστού των ζώων της ομάδας Β, παρατηρήθηκαν δερματικές αλλοιώσεις. Στην κλίμακα των Fox και συν. (1991) (Πίνακας II.i), η τιμή της βαρύτητας των αλλοιώσεων ήταν "2" έως "3". Από τα δείγματα υλικού θηλαίου πόρου και

γάλακτος, δεν απομονώθηκαν βακτήρια. Παρατηρήθηκε θετική αντίδραση ("1") στη δοκιμή CMT σε όλα τα δείγματα (12 από τα 12) γάλακτος. Στα επιχρίσματα γάλακτος παρατηρήθηκαν ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα.

Πίνακας III.xi. Βακτηριολογικά ευρήματα (απομόνωση *M. haemolytica*), αποτελέσματα της δοκιμής CMT και τιμές της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων στα ενοφθαλμισμένα ημιμόρια του μαστού προβατίνων μετά τον ενοφθαλμισμό διαφορετικών στελεχών *M. haemolytica* σε διάφορα σημεία του μαστού.

Ομάδα	Απομόνωση <i>M. haemolytica</i>			Αποτελέσματα δοκιμή CMT (θετική αντίδραση, ≥ 1) ^α	Τιμές της βαρύτητας παθολογοανατομικών ευρημάτων ^γ
	Υλικό θηλαίου πόρου ^α	Μαστικό έκκριμα ^α	Δείγματα ιστών ^β		
A1	7/12	5/12	9/12	7/12	3,5+0,5
A2	8/12	5/12	9/12	8/12	3,75+0,5
A3	4/6	2/6	6/6	4/6	3,0+0,5
A4	4/6	3/6	4/6	5/6	4,0+1,0
B1	12/12	12/12	12/12	12/12	6,5+6,5
B2	12/12	12/12	12/12	12/12	6,25+6,25
B3	6/6	6/6	6/6	6/6	6,0+6,0
B4	6/6	6/6	6/6	6/6	6,0+7,0
Γ1	0/12	12/12	6/12	12/12	0,25+6,0
Γ2	0/12	12/12	7/12	12/12	0,5+6,5
Γ3	0/6	6/6	3/6	6/6	0,25+6,0
Γ4	1/6	6/6	3/6	6/6	0,25+6,5

α. n/m = θετικά αποτελέσματα στο σύνολο των δειγμάτων που ελήφθησαν.

β. n/m = θετικά αποτελέσματα στο σύνολο των σημείων, από τα οποία ελήφθησαν δείγματα.

γ. k+l = τιμή της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων στη θηλή + τιμή της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων στο μαστικό παρέγχυμα (μέσες τιμές των ζώων κάθε υποομάδας), μέγιστες δυνατές τιμές: 8+8.

Παθολογοανατομικά ευρήματα

Βακτηριολογικά ευρήματα στα δείγματα ιστών

M. haemolytica απομονώθηκε σε καθαρή καλλιέργεια από 28 από τα 36 δείγματα ιστών (ξέσματα θηλαίου πόρου, ξέσματα θηλαίου κόλπου, μαστικό παρέγχυμα) από την ομάδα Α.

Επίσης, απομονώθηκε από όλα τα δείγματα ιστών (36 από τα 36) από την ομάδα Β και από 19 από τα 36 δείγματα ιστών από την ομάδα Γ.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα III.xi.

Από τα μη ενοφθαλμισμένα ημιμόρια των ζώων, δεν απομονώθηκαν βακτήρια.

Μακροσκοπικά νεκροτομικά και ιστοπαθολογικά ευρήματα

Από τη σύγκριση του μήκους του αυλού της θηλής με το μήκος του χρησιμοποιούμενου για τον ενοφθαλμισμό καθετήρα, επιβεβαιώθηκε ότι το ενοφθάλμισμα είχε τοποθετηθεί στο θηλαίο πόρο.

Ομάδα Α

Σε γενικές γραμμές, τα μακροσκοπικά νεκροτομικά και τα ιστοπαθολογικά ευρήματα ήταν παρόμοια με αυτά που περιγράφηκαν παραπάνω (Τμήμα Β), μετά από ενοφθαλμισμό *M. haemolytica*, στέλεχος VSM08L.

Η τιμή της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων στα ενοφθαλμισμένα ημιμόρια ήταν 50 (μέγιστη δυνατή συνολική τιμή: 192).

Στα μη ενοφθαλμισμένα ημιμόρια δεν παρατηρήθηκαν παθολογικά ευρήματα.

Ομάδα Β

Τα κύρια μακροσκοπικά παθολογοανατομικά ευρήματα στις θηλές ήταν πτυχώσεις, πετέχειες και πάχυνση του βλεννογόνου του θηλαίου πόρου. Στο δέρμα τους παρατηρήθηκαν έλκη, διάβρωση και παρουσία εφελκίδων. Ιστολογικά, παρατηρήθηκε έντονη διήθηση του επιθηλίου από ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα, παρουσία λεμφοκυττάρων και πλασμοκυττάρων, καθώς και καταστροφή ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων και επιθηλιακών κυττάρων. Χαρακτηριστική ήταν η παρουσία μεγάλου αριθμού ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων στο χόριο. Παρατηρήθηκαν συναθροίσεις λεμφοκυττάρων με εικόνα χαρακτηριστική θυλακίου, με ή χωρίς ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα και βλαστική δραστηριότητα στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου. Οι δερματικές αλλοιώσεις δεν επεκτείνονταν έως το εσωτερικό της θηλής, δηλαδή στο θηλαίο πόρο ή το θηλαίο κόλπο, καθώς το μέγιστο βάθος τους ήταν μέχρι 2,5 mm, οι δε υποκείμενοι ιστοί ήταν άθικτοι.

Στο σύστοιχο μαστικό παρέγχυμα παρατηρήθηκαν συμφόρηση, υποδόριο οίδημα και εκροή οροαιμορραγικού υγρού κατά τη διατομή του μαστικού παρεγχύματος. Τα επιχώρια λεμφογάγγλια ήταν έντονα διογκωμένα και οίδηματικά. Τα ιστοπαθολογικά ευρήματα περιλάμβαναν έντονη λευκοκυτταρική διήθηση από μακροφάγα, λεμφοκύτταρα και ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα, ρήξη αγγείων, αιμορραγίες, λύση των ουδετερόφιλων

λευκοκυττάρων και αποδιοργάνωση της αρχιτεκτονικής δομής επιθηλιακών κυττάρων και αδενοκυψελών.

Η τιμή της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων στα ενοφθαλμισμένα ημιμόρια ήταν 152 (μέγιστη δυνατή συνολική τιμή: 192).

Στα μη ενοφθαλμισμένα ημιμόρια δεν παρατηρήθηκαν παθολογικά ευρήματα.

Ομάδα Γ

Δεν παρατηρήθηκαν παθολογικά ευρήματα στις θηλές του μαστού.

Σε γενικές γραμμές, τα μακροσκοπικά νεκροτομικά και τα ιστοπαθολογικά ευρήματα στο μαστικό παρέγχυμα ήταν παρόμοια με αυτά που περιγράφηκαν παραπάνω για την ομάδα Β.

Η τιμή της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων στα ενοφθαλμισμένα ημιμόρια ήταν 79 (μέγιστη δυνατή συνολική τιμή: 192).

Στα μη ενοφθαλμισμένα ημιμόρια δεν παρατηρήθηκαν παθολογικά ευρήματα.

Όλα τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα III.xi.

Στατιστική σημαντικότητα των διαφορών στα ευρήματα μεταξύ των ομάδων

Η στατιστική σημαντικότητα των διαφορών μεταξύ των ομάδων Α, Β, και Γ για όλα τα ευρήματα μετά τον ενοφθαλμισμό (βακτηριολογικά ευρήματα, κυτταρολογικά ευρήματα, τιμή της βαρύτητας παθολογοανατομικών ευρημάτων) ήταν πάντοτε $P > 0,9$.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV

ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗΣ ΧΛΩΡΙΔΑΣ
ΣΤΟ ΘΗΛΑΙΟ ΠΟΡΟ ΤΩΝ ΠΡΟΒΑΤΩΝ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σε παλαιότερες μελέτες (Linde, Holmberg & Astrom 1980) έχει υποστηριχθεί το ενδεχόμενο πρόληψης της μαστίτιδας, μέσω της παρουσίας μικροβίων με μειωμένη παθογόνο δύναμη εντός του μαστικού παρεγχύματος. Οι πηκτάση-αρνητικοί σταφυλόκοκκοι, οι οποίοι θεωρούνται ως μικρόβια μικρής λοιμογόνου δύναμης, είναι τα συχνότερα βακτηριακά είδη στη θηλή του μαστού των προβατίνων (Fthenakis, Marples, Richardson & Jones 1994), καθώς και οι πιο συχνόι αιτιολογικοί παράγοντες της υποκλινικής μαστίτιδας στα πρόβατα (Bergonier & Berthelot 2003). Συνεπώς, μπορεί επίσης να θεωρηθεί ότι οι μικροοργανισμοί που βρίσκονται στη θηλή του μαστού και αποτελούν τη βακτηριακή χλωρίδα της θα μπορούσαν, κάτω από ορισμένες συνθήκες, να προκαλέσουν μαστίτιδα. Με τον όρο "βακτηριακή χλωρίδα" της θηλής του μαστού αναφέρονται οι πληθυσμοί βακτηρίων που βρίσκονται στο θηλαίο πόρο των προβατίνων χωρίς να προκαλούν κάποια βλάβη ή αντίδραση στο μαστικό παρέγχυμα.

Ωστόσο, η παραπάνω υπόθεση δεν έχει τεκμηριωθεί πειραματικά. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση του ρόλου των βακτηρίων που παραμένουν στο θηλαίο πόρο κλινικά υγιών προβατίνων. Αρχικά, διερευνήθηκαν οι πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ εισβαλλόντων μικροοργανισμών και βακτηριακών πληθυσμών στη θηλή του μαστού. Στη συνέχεια, μελετήθηκε ο πιθανός προδιαθέτων ρόλος των αλλοιώσεων των θηλών του μαστού στην εκδήλωση μαστίτιδας από τους βακτηριακούς πληθυσμούς που βρίσκονταν ήδη στη θηλή. Τέλος, διερευνήθηκε κατά πόσον η σταφυλοκοκκική χλωρίδα στο θηλαίο πόρο θα μπορούσε να προκαλέσει κλινική μαστίτιδα μετά από ενοφθαλμισμό απευθείας στο γαλακτοφόρο κόλπο του ζώου.

Πραγματοποιήθηκαν τρεις πειραματισμοί, μετά από εξασφάλιση σχετικής άδειας από τη Διεύθυνση Κτηνιατρικής της Νομαρχιακής Αυτοδιοίκησης Καρδίτσας. Στον πρώτο πειραματισμό, ενοφθαλμίστηκαν κλινικά υγιείς θηλές του μαστού προβατίνων, οι οποίες είχαν βακτηριακή χλωρίδα στο θηλαίο πόρο τους (πηκτάση-αρνητικούς σταφυλοκόκκους ή *Bacillus* spp.), με *Mannheimia haemolytica*, στέλεχος VSM08L. Στο δεύτερο πειραματισμό, προκλήθηκαν αλλοιώσεις στο δέρμα της θηλής του μαστού προβατίνων, οι οποίες είχαν βακτηριακή χλωρίδα στο θηλαίο πόρο τους (πηκτάση-αρνητικούς σταφυλοκόκκους), χωρίς να γίνει ενοφθαλμισμός με κάποιο βακτήριο. Τέλος στον τρίτο πειραματισμό, αξιολογήθηκε η παθογόνος δράση ενός στελέχους *Staphylococcus simulans*, που αποτελούσε τμήμα της φυσιολογικής χλωρίδας στο θηλαίο πόρο μίας από τις προβατίνες του δεύτερου πειραματισμού. Ο πειραματικός σχεδιασμός συνοψίζεται στον Πίνακα IV.i.

Πίνακας IV.i. Περιληπτική παρουσίαση του πειραματικού σχεδιασμού για αξιολόγηση της σημασίας της βακτηριακής χλωρίδας στη θηλαίο πόρο των προβατίνων.

Ομάδα / Υποομάδα	Μέθοδος ενοφθαλμισμού ή πρόκλησης αλλοιώσεων	Χρονικά σημεία ευθανασίας μετά τον ενοφθαλμισμό ή την πρόκληση αλλοιώσεων (ημέρα D0)
<i>1ος πειραματισμός: συνέπειες του ενοφθαλμισμού M. haemolytica σε θηλές του μαστού προβατίνων με βακτηριακή χλωρίδα στο θηλαίο πόρο</i>		
A1 (n=4): πηκτάση-αρνητικοί σταφυλόκοκκοι (+++) στον ένα θηλαίο πόρο	Θηλαίος πόρος με βακτήρια: ενοφθαλμισμός 1.250 cfu <i>M. haemolytica</i> (ΦΜ+/ΠΜ+) Ετερόπλευρος θηλαίος πόρος: έγχυση PBS (ΦΜ-/ΠΜ-)	D1, D3, D5, D7
A2 (n=4): πηκτάση-αρνητικοί σταφυλόκοκκοι (+++) στον ένα θηλαίο πόρο	Θηλαίος πόρος με βακτήρια: έγχυση PBS (ΦΜ+/ΠΜ-) Ετερόπλευρος θηλαίος πόρος: έγχυση PBS (ΦΜ-/ΠΜ-)	D1, D3, D5, D7
B1 (n=4): πηκτάση-αρνητικοί σταφυλόκοκκοι (+) στον ένα θηλαίο πόρο	Θηλαίος πόρος με βακτήρια: ενοφθαλμισμός 1.250 cfu <i>M. haemolytica</i> (ΦΜ+/ΠΜ+) Ετερόπλευρος θηλαίος πόρος: έγχυση PBS (ΦΜ-/ΠΜ-)	D1, D3, D5, D7
B2 (n=4): πηκτάση-αρνητικοί σταφυλόκοκκοι (+) στον ένα θηλαίο πόρο	Θηλαίος πόρος με βακτήρια: έγχυση PBS (ΦΜ+/ΠΜ-) Ετερόπλευρος θηλαίος πόρος: έγχυση PBS (ΦΜ-/ΠΜ-)	D1, D3, D5, D7
Γ1 (n=4): <i>Bacillus</i> sp. (+++) στον ένα θηλαίο πόρο	Θηλαίος πόρος με βακτήρια: ενοφθαλμισμός 1.250 cfu <i>M. haemolytica</i> (ΦΜ+/ΠΜ+) Ετερόπλευρος θηλαίος πόρος: έγχυση PBS (ΦΜ-/ΠΜ-)	D1, D3, D5, D7
Γ2 (n=4): <i>Bacillus</i> sp. (+++) στον ένα θηλαίο πόρο	Θηλαίος πόρος με βακτήρια: έγχυση PBS (ΦΜ+/ΠΜ-) Ετερόπλευρος θηλαίος πόρος: έγχυση PBS (ΦΜ-/ΠΜ-)	D1, D3, D5, D7
Δ (n=8): απουσία βακτηρίων από τους δύο θηλαίους πόρους	Ένας θηλαίος πόρος: ενοφθαλμισμός 1.250 cfu <i>M. haemolytica</i> (ΦΜ-/ΠΜ+) Ετερόπλευρος θηλαίος πόρος: έγχυση PBS (ΦΜ-/ΠΜ-)	D1 (×2), D3 (×2), D5 (×2), D7 (×2)

Πίνακας IV.i (συνέχεια).

Ομάδα / Υποομάδα	Μέθοδος ενοφθαλμισμού ή πρόκλησης αλλοιώσεων	Χρονικά σημεία ευθανασίας μετά τον ενοφθαλμισμό ή την πρόκληση αλλοιώσεων (ημέρα D0)
<i>2ος πειραματισμός: συνέπειες της πρόκλησης αλλοιώσεων σε θηλές του μαστού προβατίνων με βακτηριακή χλωρίδα στο θηλαίο πόρο</i>		
Ε (n=6): πηκτάση-αρνητικοί σταφυλόκοκκοι (+) στον ένα θηλαίο πόρο	Θηλαίος πόρος με βακτήρια: εμφάνιση της θηλής σε διάλυμα NaOH (ΦΜ+/Α+) Ετερόπλευρος θηλαίος πόρος: εμφάνιση της θηλής σε διάλυμα NaOH (ΦΜ-/Α+)	D5 (×3), D7 (×3)
ΣΤ (n=6): πηκτάση-αρνητικοί σταφυλόκοκκοι (+) στον ένα θηλαίο πόρο	Θηλαίος πόρος με βακτήρια: καμία παρέμβαση (ΦΜ+/Α-) Ετερόπλευρος θηλαίος πόρος: καμία παρέμβαση (ΦΜ-/Α-)	D5 (×3), D7 (×3)
Ζ (n=6): απουσία βακτηρίων από τους δύο θηλαίους πόρους	Ένας θηλαίος πόρος: εμφάνιση της θηλής σε διάλυμα NaOH (ΦΜ-/Α+) Ετερόπλευρος θηλαίος πόρος: καμία παρέμβαση (ΦΜ-/Α-)	D5 (×3), D7 (×3)
<i>3ος πειραματισμός: συνέπειες του ενοφθαλμισμού βακτηριακής χλωρίδας (S. simulans) του θηλαίου πόρου στο μαστό υγιών προβατίνων</i>		
Η (n=4): απουσία βακτηρίων από τους δύο θηλαίους πόρους	Ένα ημιμόριο του μαστού: ενοφθαλμισμός 10^6 cfu <i>S. simulans</i> , στο θηλαίο πόρο (θηλή: ΦΜ-/ΠΜ+ , αδένες: ΦΜ-/ΠΜ-) Ετερόπλευρα: έγχυση PBS (θηλή: ΦΜ-/ΠΜ- , μαστικός αδένες: ΦΜ-/ΠΜ-)	D5 (×2), D7 (×2)
Θ (n=4): απουσία βακτηρίων από τους δύο θηλαίους πόρους	Ένα ημιμόριο του μαστού: ενοφθαλμισμός 10^6 cfu <i>S. simulans</i> στο γαλακτοφόρο κόλπο (θηλή: ΦΜ-/ΠΜ- , αδένες: ΦΜ-/ΠΜ+) Ετερόπλευρα: έγχυση PBS (θηλή: ΦΜ-/ΠΜ- , μαστικός αδένες: ΦΜ-/ΠΜ-)	D5 (×2), D7 (×2)

Απουσία βακτηρίων από το γάλα όλων των ζώων.

ΦΜ: φυσική μόλυνση, **ΠΜ**: πειραματική μόλυνση, **Α**: πρόκληση δερματικών αλλοιώσεων.

(×2) = δύο ζώα σε κάθε σημείο ευθανασίας.

(×3) = τρία ζώα σε κάθε σημείο ευθανασίας.

B. ΣΥΝΕΠΕΙΕΣ ΤΟΥ ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΟΥ *MANNHEIMIA HAEMOLYTICA* ΣΤΗ ΘΗΛΗ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΠΡΟΒΑΤΩΝ, ΜΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΧΛΩΡΙΔΑ ΣΤΟ ΘΗΛΑΙΟ ΠΟΡΟ ΤΟΥΣ

Υλικά και μέθοδοι

Πειραματικός σχεδιασμός

Στον πειραματισμό χρησιμοποιήθηκαν 24 ενήλικες προβατίνες Καραγκούνικης φυλής (ηλικίας 3 έως 5 ετών), καθώς και 8 πρωτοτόκες προβατίνες, κατά τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου τους. Τα ζώα προέρχονταν από εκτροφή της περιοχής Καρδίτσας. Η διαχείριση των ζώων κατά τη διάρκεια του πειραματισμού, ήταν όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο II, Τμήμα Β).

Για την επιλογή των 24 ενήλικων ζώων έγιναν τρεις εξετάσεις και δειγματοληψίες, με μεσοδιάστημα δύο ημερών. Οι εξετάσεις αφορούσαν σε γενική κλινική εξέταση των ζώων και κλινική εξέταση των μαστικών αδένων και των θηλών τους (Fthenakis 1994, Mavrogianni και συν. 2005). Λαμβάνονταν δείγματα υλικού θηλαίου πόρου και γάλακτος για βακτηριολογική και κυτταρολογική εξέταση, όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο II, Τμήμα Β).

Η επιλογή των ζώων βασίστηκε στην ταυτόχρονη πλήρωση των παρακάτω πέντε κριτηρίων και στις τρεις δειγματοληψίες που έγιναν.

- α. Ύπαρξη κλινικά υγιών μαστικών αδένων και θηλών.
- β. Μη απομόνωση βακτηρίων από το γάλα.
- γ. Αρνητική αντίδραση (<"1") της δοκιμής CMT.
- δ. Απομόνωση βακτηρίων από το υλικό μόνον ενός θηλαίου πόρου (δεξιού ή αριστερού) σε καθαρή καλλιέργεια.
- ε. Μη απομόνωση βακτηρίων από το υλικό του ετερόπλευρου θηλαίου πόρου.

Ανάλογα με το είδος των μικροοργανισμών που απομονώθηκαν από το υλικό του θηλαίου πόρου, τα ζώα χωρίστηκαν στις παρακάτω ομάδες: ομάδα Α (n=8) με ζώα από το θηλαίο πόρο των οποίων απομονώθηκαν πηκτάση-αρνητικοί σταφυλόκοκκοι (4 *S. epidermidis*, 4 *S. simulans*) σε έντονη (+++) ανάπτυξη, ομάδα Β (n=8) με ζώα από το θηλαίο πόρο των οποίων απομονώθηκαν πηκτάση-αρνητικοί σταφυλόκοκκοι (4 *S. epidermidis*, 4 *S. simulans*) σε μέτρια (+) ανάπτυξη και ομάδα Γ (n=8) με ζώα από το θηλαίο πόρο των οποίων απομονώθηκαν

Bacillus spp. σε έντονη ανάπτυξη (+++). Κάθε ομάδα χωρίστηκε σε δύο υποομάδες, 1 και 2 (n=4).

Στη συνέχεια, από τις οκτώ προβατίνες κάθε ομάδας, οι τέσσερις (οι οποίες τοποθετήθηκαν στις υποομάδες A1, B1, Γ1) ενοφθαλμίστηκαν με 1.250 cfu (διακύμανση: 1.225-1.275 cfu) *M. haemolytica*, στέλεχος VSM08L. Οι υπόλοιπες τέσσερις (οι οποίες τοποθετήθηκαν στις υποομάδες A2, B2, Γ2) χρησιμοποιήθηκαν ως μη ενοφθαλμισμένοι θετικοί μάρτυρες (δηλαδή, με βακτηριακή χλωρίδα στο θηλαίο πόρο). Κατά τη διάρκεια του πειραματισμού, τα πειραματόζωα αρμέγονταν, πάντοτε από το ίδιο άτομο, τρεις φορές καθημερινά.

Σε ό,τι αφορά στις πρωτοτόκες προβατίνες (ομάδα Δ), από κανένα ζώο, δεν είχαν απομονωθεί βακτήρια από το υλικό του θηλαίου πόρου ή το γάλα, από τον τοκετό έως την έναρξη του πειραματισμού. Τα αρνιά τους απογαλακτίστηκαν τη 18η ημέρα μετά τον τοκετό. Στη συνέχεια, τα πειραματόζωα αρμέγονταν, πάντοτε από το ίδιο άτομο, τρεις φορές καθημερινά. Μία θηλή του μαστού κάθε ζώου ενοφθαλμίστηκε με 1.250 cfu (διακύμανση: 1.210-1.280 cfu) *M. haemolytica*, στέλεχος VSM08L, δύο ημέρες αργότερα (20ή ημέρα της γαλακτικής περιόδου). Τα ζώα αυτά χρησιμοποιήθηκαν ως ενοφθαλμισμένοι αρνητικοί μάρτυρες (δηλαδή, χωρίς βακτηριακή χλωρίδα στο θηλαίο πόρο).

Η προετοιμασία των ζώων για τον ενοφθαλμισμό, η προετοιμασία των στελεχών *M. haemolytica* και η μέθοδος ενοφθαλμισμού έχουν περιγραφεί προηγουμένως (Κεφάλαιο III, Τμήμα Β). Στο αντίστοιχο σημείο της άλλης θηλής του μαστού των ζώων των υποομάδων A1, B1, Γ1 και της ομάδας Δ, καθώς επίσης και στις δύο θηλές του μαστού των ζώων των υποομάδων A2, B2, Γ2 έγινε έγχυση 0,2 mL στείρου PBS.

Συνοπτικά, η ύπαρξη φυσικής μόλυνσης (ΦΜ) ή/και η πραγματοποίηση πειραματικής μόλυνσης (ΠΜ) στις θηλές του μαστού των ζώων ήταν ως εξής:

υποομάδες A1, B1, Γ1: μία θηλή ΦΜ+/ΠΜ+, ετερόπλευρη θηλή ΦΜ-/ΠΜ-,

υποομάδες A2, B2, Γ2: μία θηλή ΦΜ+/ΠΜ-, ετερόπλευρη θηλή ΦΜ-/ΠΜ-,

ομάδα Δ: μία θηλή ΦΜ-/ΠΜ+, ετερόπλευρη θηλή ΦΜ-/ΠΜ-.

Ο πειραματικός σχεδιασμός συνοψίζεται στον Πίνακα IV.i.

Εξετάσεις πριν και μετά τον ενοφθαλμισμό

Πραγματοποιούνταν κλινική εξέταση των ζώων και λαμβάνονταν δείγματα υλικού θηλαίου πόρου και γάλακτος, όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο III, Τμήμα Β), για βακτηριολογική και κυτταρολογική εξέταση. Επίσης, έγινε παθολογοανατομική εξέταση (μακροσκοπική νεκροτομική και ιστοπαθολογική εξέταση) μετά από ευθανασία των ζώων, όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο III, Τμήμα Β), στα χρονικά σημεία που αναφέρονται στον Πίνακα IV.i. Σε όλα τα στελέχη πηκτάση-αρνητικών σταφυλοκόκκων εφαρμόστηκαν η ταχεία δοκιμή "API-Staph SYSTEM" και μία πλήρης σειρά βιοχημικών δοκιμών. Έτσι έγινε δυνατή η σύγκριση των βιοχημικών αποτελεσμάτων της εξέτασης των βακτηριακών στελεχών.

Υπολογισμοί και στατιστική ανάλυση

Για τη σύγκριση αναλογιών μεταξύ αποτελεσμάτων (βακτηριολογική εξέταση, δοκιμή CMT) σε διαφορετικές υποομάδες εφαρμόστηκαν η δοκιμή χ^2 και η δοκιμή "Fisher-Exact". Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε η μη παραμετρική δοκιμή Friedman για την εκτίμηση διαφορών μεταξύ των υποομάδων. Όπου απαιτήθηκε υπολογισμός πιθανοτήτων, καθορίστηκε δίπλευρο διάστημα εμπιστοσύνης 95% (CI) ή εναλλακτικά 97,5% (όταν η αναλογία ήταν ακριβώς 0% ή 100%).

Για την εκτίμηση της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων χρησιμοποιήθηκε το σύστημα βαθμολόγησης που περιγράφηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο III, Τμήμα Β).

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα Minitab 15 (Minitab Inc., State College, PA, ΗΠΑ) και Stata-9 (Stata Corporation LP, College Station, TX, ΗΠΑ).

Κατά τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η τιμή $P < 0,05$ για τον ορισμό της στατιστικής σημαντικότητας.

Αποτελέσματα

Ευρήματα πριν τον ενοφθαλμισμό

Όλες οι προβατίνες ήταν κλινικά υγιείς πριν τον ενοφθαλμισμό τους. Οι θηλές του μαστού ήταν μαλακές, χωρίς αλλοιώσεις. Τα ζώα των ομάδων Α, Β και Γ πληρούσαν όλα τα κριτήρια επιλογής (α έως ε). Σε ό, τι αφορά στα ζώα της ομάδας Δ, δεν απομονώθηκαν βακτήρια από το υλικό του θηλαίου πόρου και από το γάλα και η αντίδραση της δοκιμής CMT ήταν αρνητική (<1) σε όλα τα δείγματα. Στα επιχρίσματα γάλακτος δεν παρατηρήθηκαν λευκοκύτταρα.

Κλινικά, βακτηριολογικά και κυτταρολογικά ευρήματα μετά τον ενοφθαλμισμό

Υποομάδες Α1, Β1, Γ1

Θηλές του μαστού με βακτηριακή χλωρίδα, ενοφθαλμισμένες (ΦΜ+/ΠΜ+)

Καμία προβατίνα δεν εκδήλωσε κλινική μαστίτιδα.

M. haemolytica απομονώθηκε από 16 από τα 32 δείγματα υλικού θηλαίου πόρου και γάλακτος από τα ζώα της υποομάδας Α1. Επίσης, το βακτήριο απομονώθηκε από 24 από τα 32 δείγματα από τα ζώα της υποομάδας Β1 και από 25 από τα 32 δείγματα από τα ζώα της υποομάδας Γ1.

Η εκάστοτε προϋπάρχουσα βακτηριακή χλωρίδα (όπως επιβεβαιώθηκε με τα αποτελέσματα της ταχείας δοκιμής API) απομονώθηκε από 10 από τα 32 δείγματα υλικού θηλαίου πόρου και γάλακτος από τα ζώα της υποομάδας Α1. Επίσης, απομονώθηκε από 14 από τα 32 δείγματα από τα ζώα της υποομάδας Β1 και από 15 από τα 32 δείγματα από τα ζώα της υποομάδας Γ1.

Θετική αντίδραση (≥ 1) στη δοκιμή CMT παρατηρήθηκε την ημέρα D1 στα δείγματα γάλακτος 8 από τις 12 προβατίνες και την ημέρα D2 στα δείγματα γάλακτος όλων των ζώων (12 από τα 12). Συνολικά, θετική αντίδραση παρατηρήθηκε σε 42 από τα 48 δείγματα γάλακτος. Στα επιχρίσματα γάλακτος παρατηρήθηκαν αρχικά (μέχρι την ημέρα D2), κυρίως ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα ($\geq 80\%$) και σε μικρότερο ποσοστό μακροφάγα και λεμφοκύτταρα (5-15%). Στη συνέχεια, το ποσοστό των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων μειώθηκε (30-70%) και αντίστοιχα αυξήθηκε αυτό των μακροφάγων και των λεμφοκυττάρων (0-30% και 10-50%, αντίστοιχα).

Θηλές του μαστού χωρίς βακτηριακή χλωρίδα, μη ενοφθαλμισμένες (ΦΜ-/ΠΜ-)

Καμία προβατίνα δεν εκδήλωσε κλινική ή υποκλινική μαστίτιδα.
Από κανένα δείγμα υλικού θηλαίου πόρου ή γάλακτος δεν απομονώθηκαν βακτήρια.
Σε όλα τα δείγματα γάλακτος, παρατηρήθηκε αρνητική (<"1") αντίδραση στη δοκιμή CMT. Στα επιχρίσματα γάλακτος παρατηρήθηκαν περιστασιακά λίγα μακροφάγα.

Υποομάδες A2, B2, Γ2

Θηλές του μαστού με βακτηριακή χλωρίδα, μη ενοφθαλμισμένες (ΦΜ+/ΠΜ-)

Καμία προβατίνα δεν εκδήλωσε κλινική ή υποκλινική μαστίτιδα.
Η εκάστοτε προϋπάρχουσα βακτηριακή χλωρίδα (όπως επιβεβαιώθηκε με τα αποτελέσματα της ταχείας δοκιμής API) απομονώθηκε από όλα τα δείγματα υλικού θηλαίου πόρου (16 από τα 16), όχι όμως από τα δείγματα γάλακτος, από όλα τα ζώα των υποομάδων A2, B2 και Γ2.

Σε όλα τα δείγματα γάλακτος, παρατηρήθηκε αρνητική (<"1") αντίδραση στη δοκιμή CMT. Στα επιχρίσματα γάλακτος παρατηρήθηκαν περιστασιακά λίγα μακροφάγα.

Θηλές του μαστού χωρίς βακτηριακή χλωρίδα, μη ενοφθαλμισμένες (ΦΜ-/ΠΜ-)

Καμία προβατίνα δεν εκδήλωσε κλινική ή υποκλινική μαστίτιδα.
Από κανένα δείγμα υλικού θηλαίου πόρου ή γάλακτος δεν απομονώθηκαν βακτήρια.
Σε όλα τα δείγματα γάλακτος, παρατηρήθηκε αρνητική (<"1") αντίδραση στη δοκιμή CMT. Στα επιχρίσματα γάλακτος δεν παρατηρήθηκαν λευκοκύτταρα.

Ομάδα Δ

Θηλές του μαστού χωρίς βακτηριακή χλωρίδα, ενοφθαλμισμένες (ΦΜ-/ΠΜ+)

Καμία προβατίνα δεν εκδήλωσε κλινική μαστίτιδα.
M. haemolytica απομονώθηκε σε καθαρή καλλιέργεια, από 49 από τα 64 δείγματα υλικού θηλαίου πόρου και γάλακτος από τα ζώα της ομάδας Δ.

Θετική αντίδραση ($\geq$ "1") στη δοκιμή CMT παρατηρήθηκε την ημέρα D1 στα δείγματα γάλακτος 6 από τις 8 προβατίνες και την ημέρα D2 στα δείγματα γάλακτος όλων των ζώων. Συνολικά, θετική αντίδραση παρατηρήθηκε σε 28 από τα 32 δείγματα γάλακτος. Στα επιχρίσματα γάλακτος παρατηρήθηκαν αρχικά (μέχρι την ημέρα D2), κυρίως ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα ($\geq$ 85%) και σε μικρότερο ποσοστό μακροφάγα και λεμφοκύτταρα (5-10%). Στη συνέχεια, το ποσοστό των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων μειώθηκε (40-60%) και αντίστοιχα αυξήθηκε αυτό των μακροφάγων και των λεμφοκυττάρων (5-30% και 10-40%, αντίστοιχα).

Θηλές του μαστού χωρίς βακτηριακή χλωρίδα, μη ενοφθαλμισμένες (ΦΜ-/ΠΜ-)

Καμία προβατίνα δεν εκδήλωσε κλινική ή υποκλινική μαστίτιδα.

Από κανένα δείγμα υλικού θηλαίου πόρου ή γάλακτος δεν απομονώθηκαν βακτήρια.

Σε όλα τα δείγματα γάλακτος, παρατηρήθηκε αρνητική (<"1") αντίδραση στη δοκιμή CMT. Στα επιχρίσματα γάλακτος δεν παρατηρήθηκαν λευκοκύτταρα.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα IV.ii.

Η στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων παρουσιάζεται στον Πίνακα IV.iii.

Πίνακας IV.ii. Βακτηριολογικά ευρήματα (απομόνωση *M. haemolytica* ή/και βακτηριακής χλωρίδας) και αποτελέσματα της δοκιμής CMT μετά τον ενοφθαλμισμό *M. haemolytica* στο θηλαίο πόρο προβατίνων με προϋπάρχουσα βακτηριακή χλωρίδα.

	Χρονικό σημείο του πειραματισμού / Υποομάδες																				
	D1 ^α							D2 ^α							D3 ^α						
	A1	A2	B1	B2	Γ1	Γ2	Δ	A1	A2	B1	B2	Γ1	Γ2	Δ	A1	A2	B1	B2	Γ1	Γ2	Δ
Απομόνωση βακτηρίων																					
ΘΠ - βχ ^β	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	0/8	2/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/6	2/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/6
ΘΠ - Μh ^β	4/4	0/4	4/4	0/4	4/4	0/4	8/8	2/3	0/3	3/3	0/3	3/3	0/3	6/6	2/3	0/3	3/3	0/3	3/3	0/3	6/6
ΓΑ - βχ ^β	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/8	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/6	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/6
ΓΑ - Μh ^β	1/4	0/4	1/4	0/4	2/4	0/4	3/8	1/3	0/3	1/3	0/3	2/3	0/3	4/6	2/3	0/3	2/3	0/3	2/3	0/3	4/6
Αποτελέσματα δοκιμής CMT																					
Θετική αντίδραση (≥"1")	3/4	0/4	2/4	0/4	3/4	0/4	6/8	3/3	0/3	3/3	0/3	3/3	0/3	6/6	3/3	0/3	3/3	0/3	3/3	0/3	5/6

Πίνακας IV.ii. (συνέχεια).

	Χρονικό σημείο του πειραματισμού / Υποομάδες																				
	D4 ^a							D5 ^a							D6 ^a						
	A1	A2	B1	B2	Γ1	Γ2	Δ	A1	A2	B1	B2	Γ1	Γ2	Δ	A1	A2	B1	B2	Γ1	Γ2	Δ
Απομόνωση βακτηρίων																					
ΘΠ - βχ	1/2	2/2	1/2	2/2	1/2	2/2	0/4	1/2	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	0/4	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	0/2
ΘΠ - Mh	1/2	0/2	2/2	0/2	2/2	0/2	4/4	1/2	0/2	1/2	0/2	1/2	0/2	3/4	0/1	0/1	1/1	0/1	1/1	0/1	1/2
ΓΑ - βχ	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/4	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/4	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2
ΓΑ - Mh	1/2	0/2	2/2	0/2	2/2	0/2	3/4	1/2	0/2	2/2	0/2	1/1	0/2	3/4	0/1	0/1	1/1	0/1	1/1	0/1	2/2
Αποτελέσματα δοκιμής CMT																					
Θετική αντίδραση (≥"1")	2/2	0/2	2/2	0/2	1/2	0/2	3/4	1/2	0/2	2/2	0/2	2/2	0/2	4/4	1/1	0/1	1/1	0/1	1/1	0/1	2/2

Πίνακας IV.ii. (συνέχεια).

	Χρονικό σημείο του πειραματισμού / Υποομάδες													
	D7 ^α							Σύνολο						
	A1	A2	B1	B2	Γ1	Γ2	Δ	A1	A2	B1	B2	Γ1	Γ2	Δ
Απομόνωση βακτηρίων														
ΘΠ - βχ	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	0/2	10/16	16/16	14/16	16/16	15/16	16/16	0/32
ΘΠ - <i>Mh</i>	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1	1/2	10/16	0/16	14/16	0/16	15/16	0/16	29/32
ΓΑ - βχ	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/16	0/16	0/16	0/16	0/16	0/16	0/32
ΓΑ - <i>Mh</i>	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	1/2	6/16	0/16	10/16	0/16	10/16	0/16	20/32
Αποτελέσματα δοκιμής CMT														
Θετική αντίδραση (≥"1")	1/1	0/1	1/1	0/1	1/1	0/1	2/2	14/16	0/16	14/16	0/16	14/16	0/16	28/32

α. D1, D2, κ.λπ. = ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό.

β. ΘΠ - βχ = θηλαίος πόρος - βακτηριακή χλωρίδα, ΘΠ - *Mh* = θηλαίος πόρος - *M. haemolytica*, ΓΑ - βχ = γάλα - βακτηριακή χλωρίδα, ΓΑ - *Mh* = γάλα - *M. haemolytica*.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως n/m=θετικά αποτελέσματα στο σύνολο των δειγμάτων που ελήφθησαν.

Πίνακας IV.iii. Στατιστική σημαντικότητα ($P=$) των διαφορών των αποτελεσμάτων της βακτηριολογικής εξέτασης και των αποτελεσμάτων της δοκιμής CMT μεταξύ των διαφόρων ομάδων/υποομάδων, μετά τον ενοφθαλμισμό *M. haemolytica* στο θηλαίο πόρο προβατίνων με προϋπάρχουσα βακτηριακή χλωρίδα.

Σύγκριση μεταξύ	Αποτελέσματα βακτηριολογικής εξέτασης				Αποτελέσματα δοκιμής CMT
	ΘΠ - βχ ^α	ΘΠ - Mh ^α	ΓΑ - βχ ^α	ΓΑ - Mh ^α	
A1 - A2	0,018	<0,001	1,00	0,018	<0,001
A1 - Δ	<0,001	0,044	1,00	0,101	1,00
B1 - B2	0,484	<0,001	1,00	<0,001	<0,001
B1 - Δ	<0,001	>0,9	1,00	>0,9	1,00
Γ1 - Γ2	>0,9	<0,001	1,00	<0,001	<0,001
Γ1 - Δ	<0,001	>0,9	1,00	>0,9	1,00
A1 - B1 - Γ1	0,046	0,046	1,00	>0,25	>0,25

α. ΘΠ - βχ = θηλαίος πόρος - βακτηριακή χλωρίδα, ΘΠ - Mh = θηλαίος πόρος - *M. haemolytica*, ΓΑ - βχ = γάλα - βακτηριακή χλωρίδα, ΓΑ - Mh = γάλα - *M. haemolytica*.

Παθολογοανατομικά ευρήματα

Βακτηριολογικά ευρήματα στα δείγματα ιστών

Υποομάδες A1, B1, Γ1 - θηλής του μαστού με βακτηριακή χλωρίδα, ενοφθαλμισμένες (ΦΜ+/ΠΜ+)

M. haemolytica απομονώθηκε από 4, 10 και 9 από τα 12 δείγματα ξεσμάτων θηλαίου πόρου, θηλαίου κόλπου και μαστικού παρεγχύματος των ζώων της υποομάδας A1, B1 και Γ1, αντίστοιχα. Η προϋπάρχουσα βακτηριακή χλωρίδα (όπως επιβεβαιώθηκε με τα αποτελέσματα της ταχείας δοκιμής API) απομονώθηκε από τα ξέσματα θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου, όχι όμως από τα δείγματα του μαστικού παρεγχύματος. Συγκεκριμένα, απομονώθηκε από 3, 8 και 8 από τα 12 δείγματα των ζώων της υποομάδας A1, B1 και Γ1, αντίστοιχα.

Η στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς απομόνωσης *M. haemolytica* από τα δείγματα ιστών μεταξύ των τριών υποομάδων ήταν $P=0,024$. Η στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς απομόνωσης βακτηριακής χλωρίδας από τα δείγματα ιστών μεταξύ των τριών υποομάδων ήταν $P=0,062$.

Υποομάδες A1, B1, Γ1 - θηλής του μαστού χωρίς βακτηριακή χλωρίδα, μη ενοφθαλμισμένες (ΦΜ-/ΠΜ-)

Από καμία προβατίνα δεν απομονώθηκαν βακτήρια από τα μη ενοφθαλμισμένα ημιμόρια.

Υποομάδες A2, B2, Γ2 - θηλές του μαστού με βακτηριακή χλωρίδα, μη ενοφθαλμισμένες (ΦΜ+/ΠΜ-)

Η προϋπάρχουσα βακτηριακή χλωρίδα (όπως επιβεβαιώθηκε με τα αποτελέσματα της ταχείας δοκιμής API) απομονώθηκε από τα ξέσματα θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου, όχι όμως από τα δείγματα του μαστικού παρεγχύματος. Συγκεκριμένα, απομονώθηκε από 7, 8 και 7 από τα 12 δείγματα των ζώων της υποομάδας A2, B2 και Γ2, αντίστοιχα.

Η στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς απομόνωσης βακτηριακής χλωρίδας από τα δείγματα ιστών μεταξύ των τριών υποομάδων ήταν $P=0,89$.

Υποομάδες A2, B2, Γ2 - θηλές του μαστού χωρίς βακτηριακή χλωρίδα, μη ενοφθαλμισμένες (ΦΜ-/ΠΜ-)

Από καμία προβατίνα δεν απομονώθηκαν βακτήρια από τα μη ενοφθαλμισμένα ημιμόρια.

Ομάδα Δ - θηλές του μαστού χωρίς βακτηριακή χλωρίδα, ενοφθαλμισμένες (ΦΜ-/ΠΜ+)

M. haemolytica απομονώθηκε σε καθαρή καλλιέργεια από 15 από τα 24 δείγματα (0,625, 95% CI 0,41-0,81) ξεσμάτων θηλαίου πόρου, θηλαίου κόλπου και μαστικού παρεγχύματος.

Η στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς απομόνωσης *M. haemolytica* από τα δείγματα μεταξύ της υποομάδας A1 και της ομάδας Δ ήταν $P=0,044$. Η στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς απομόνωσης *M. haemolytica* από τα δείγματα μεταξύ της υποομάδας B1 ή της υποομάδας Γ1 και της ομάδας Δ ήταν $P>0,4$.

Ομάδες Δ - θηλές του μαστού χωρίς βακτηριακή χλωρίδα, μη ενοφθαλμισμένες (ΦΜ-/ΠΜ-)

Από καμία προβατίνα δεν απομονώθηκαν βακτήρια από τα μη ενοφθαλμισμένα ημιμόρια.

Τα βακτηριολογικά ευρήματα στα δείγματα ιστών παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα IV.iv.

Πίνακας IV.iv. Βακτηριολογικά ευρήματα (απομόνωση *M. haemolytica* ή/και βακτηριακής χλωρίδας) σε δείγματα ιστών μετά τον ενοφθαλμισμό *M. haemolytica* στο θηλαίο πόρο προβατίνων με προϋπάρχουσα βακτηριακή χλωρίδα.

	Χρονικό σημείο του πειραματισμού / Υποομάδες													
	D1 ^a							D3 ^a						
	A1	A2	B1	B2	Γ1	Γ2	Δ	A1	A2	B1	B2	Γ1	Γ2	Δ
ΘΠ - βχ ^β	1/1 ^β	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	0/2	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	0/2
ΘΠ - Μh ^β	1/1	0/1	1/1	0/1	1/1	0/1	2/2	0/1	0/1	1/1	0/1	1/1	0/1	2/2
ΘΚ - βχ ^β	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	0/2	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	0/2
ΘΚ - Μh ^β	1/1	0/1	1/1	0/1	1/1	0/1	1/2	0/1	0/1	1/1	0/1	1/1	0/1	2/2
ΜΠ - βχ ^β	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2
ΜΠ - Μh ^β	1/1	0/1	1/1	0/1	1/1	0/1	1/2	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1	1/2
	D5 ^a							D7 ^a						
	A1	A2	B1	B2	Γ1	Γ2	Δ	A1	A2	B1	B2	Γ1	Γ2	Δ
ΘΠ - βχ	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	0/2	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	0/2
ΘΠ - Μh	1/1	0/1	1/1	0/1	1/1	0/1	2/2	0/1	0/1	1/1	0/1	1/1	0/1	1/2
ΘΚ - βχ	0/1	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1	0/2	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1	0/2
ΘΚ - Μh	0/1	0/1	1/1	0/1	1/1	0/1	1/2	0/1	0/1	1/1	0/1	1/1	0/1	1/2
ΜΠ - βχ	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2
ΜΠ - Μh	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	1/2	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1	0/2

α. D1, D3, κ.λπ. = ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό.

β. ΘΠ - βχ = θηλαίος πόρος - βακτηριακή χλωρίδα, ΘΠ - Μh = θηλαίος πόρος - *M. haemolytica*, ΘΚ - βχ = θηλαίος κόλπος - βακτηριακή χλωρίδα, ΘΚ - Μh = θηλαίος κόλπος - *M. haemolytica*, ΜΠ - βχ = μαστικό παρέγχυμα - βακτηριακή χλωρίδα, ΜΠ - Μh = μαστικό παρέγχυμα - *M. haemolytica*.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως n/m=θετικά αποτελέσματα στο σύνολο των δειγμάτων που ελήφθησαν.

Μακροσκοπικά νεκροτομικά και ιστοπαθολογικά ευρήματα

Από τη σύγκριση του μήκους του αυλού της θηλής με το μήκος του χρησιμοποιούμενου για τον ενοφθαλμισμό καθετήρα, επιβεβαιώθηκε ότι το ενοφθάλμισμα είχε τοποθετηθεί στο θηλαίο πόρο.

Υποομάδες A1, B1, Γ1 - θηλής του μαστού με βακτηριακή χλωρίδα, ενοφθαλμισμένες (ΦΜ+/ΠΜ+)

Η εσωτερική επιφάνεια της θηλής είχε πτυχώσεις και ήπια πάχυνση του βλεννογόνου. Το κύριο ιστοπαθολογικό εύρημα ήταν η λευκοκυτταρική διήθηση του επιθηλίου, η οποία ήταν αυξημένη στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου, καθώς και στο θηλαίο κόλπο. Παρατηρήθηκαν ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα, λεμφοκύτταρα και πλασμοκύτταρα. Σε κάποιες θηλές παρατηρήθηκαν επίσης συναθροίσεις λεμφοκυττάρων με εικόνα χαρακτηριστική θυλακίου με ή χωρίς ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα και βλαστική δραστηριότητα, στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου.

Στο μαστικό παρέγχυμα και τα επιχώρια λεμφογάγγλια δεν παρατηρήθηκαν μακροσκοπικά νεκροτομικά παθολογικά ευρήματα. Ιστολογικά παρατηρήθηκαν λευκοκυτταρική

δίήθηση (κυρίως ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα), λύση ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων και ρήξη αγγείων.

Το άθροισμα των τιμών της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων ήταν 27, 33 και 35 (μέγιστη δυνατή συνολική τιμή: 64) για την υποομάδα A1, B1 και Γ1, αντίστοιχα.

Η στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς της τιμής της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων μεταξύ των τριών υποομάδων ήταν $P=0,041$.

Υποομάδες A1, B1, Γ1 - θηλής του μαστού χωρίς βακτηριακή χλωρίδα, μη ενοφθαλμισμένες (ΦΜ-/ΠΜ-)

Δεν παρατηρήθηκαν παθολογικά ευρήματα στις θηλές και το σύστοιχο μαστικό παρέγχυμά τους.

Το άθροισμα των τιμών της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων ήταν 0 (μέγιστη δυνατή συνολική τιμή: 64) για καθεμιά από τις υποομάδες.

Υποομάδες A2, B2, Γ2 - θηλής του μαστού με βακτηριακή χλωρίδα, μη ενοφθαλμισμένες (ΦΜ+/ΠΜ-)

Δεν παρατηρήθηκαν μακροσκοπικές αλλοιώσεις στις θηλές των ζώων αυτών. Το κύριο ιστοπαθολογικό εύρημα ήταν η ήπια λευκοκυτταρική δίήθηση του επιθηλίου. Παρατηρήθηκαν λευκοκύτταρα ως μικρής έκτασης συναθροίσεις κυττάρων κάτω από τον βασικό υμένα του επιθηλίου, καθώς και σε βαθύτερα στρώματά του. Στο θηλαίο κόλπο επικρατούσαν λεμφοκύτταρα, περιστασιακά όμως βρέθηκαν και ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα. Αντίθετα, στο θηλαίο πόρο, βρέθηκαν λεμφοκύτταρα και ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα σε περίπου ίση αναλογία (κάθε είδος κυττάρων >45% των συνολικών λευκοκυττάρων). Στις 6 από τις 12 θηλές παρατηρήθηκαν επίσης συναθροίσεις λεμφοκυττάρων, όπως περιγράφηκαν παραπάνω [υποομάδες A1, B1, Γ1 - θηλής με βακτηριακή χλωρίδα, ενοφθαλμισμένες (ΦΜ+/ΠΜ+)].

Στο μαστικό παρέγχυμα και τα επιχώρια λεμφογάγγλια δεν παρατηρήθηκαν νεκροτομικά παθολογικά ευρήματα.

Το άθροισμα των τιμών της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων ήταν 8, 8 και 6 (μέγιστη δυνατή συνολική τιμή: 64) για την υποομάδα A2, B2 και Γ2, αντίστοιχα.

Η στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς της τιμής της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων μεταξύ των τριών υποομάδων ήταν $P=0,37$.

Υποομάδες A2, B2, Γ2 - θηλής του μαστού χωρίς βακτηριακή χλωρίδα, μη ενοφθαλμισμένες (ΦΜ-/ΠΜ-)

Δεν παρατηρήθηκαν παθολογικά ευρήματα στις θηλές και το σύστοιχο μαστικό παρέγχυμά τους.

Το άθροισμα των τιμών της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων ήταν 0 (μέγιστη δυνατή συνολική τιμή: 64) για καθεμιά από τις υποομάδες.

Ομάδα Δ - θηλής του μαστού χωρίς βακτηριακή χλωρίδα, ενοφθαλμισμένες (ΦΜ-/ΠΜ+)

Η εσωτερική επιφάνεια της θηλής ήταν ανώμαλη, είχε δε πτυχώσεις και ήπια πάχυνση του βλεννογόνου. Σε γενικές γραμμές τα ιστοπαθολογικά ευρήματα ήταν παρόμοια με αυτά που περιγράφηκαν παραπάνω [υποομάδες A1, B1, Γ1 - θηλής του μαστού με βακτηριακή χλωρίδα, ενοφθαλμισμένες (ΦΜ+/ΠΜ+)].

Στο μαστικό παρέγχυμα και τα επιχώρια λεμφογάγγλια δεν παρατηρήθηκαν μακροσκοπικά νεκροτομικά παθολογικά ευρήματα. Ιστολογικά παρατηρήθηκαν λευκοκυτταρική διήθηση (κυρίως ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα), λύση ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων και ρήξη αγγείων.

Το άθροισμα των τιμών της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων ήταν 72 (μέγιστη δυνατή συνολική τιμή: 128).

Η στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς της τιμής της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων μεταξύ της υποομάδας A1 και της ομάδας Δ ήταν $P=0,038$. Η στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς της τιμής της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων μεταξύ της υποομάδας B1 ή της υποομάδας Γ1 και της ομάδας Δ ήταν $P>0,6$.

Ομάδα Δ - θηλής του μαστού χωρίς βακτηριακή χλωρίδα, μη ενοφθαλμισμένες (ΦΜ-/ΠΜ-)

Δεν παρατηρήθηκαν παθολογικά ευρήματα στις θηλές και το σύστοιχο μαστικό παρέγχυμά τους.

Το άθροισμα των τιμών της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων ήταν 0 (μέγιστη δυνατή: 128).

Τα αποτελέσματα της τιμής της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων στα ενοφθαλμισμένα ημιμόρια παρουσιάζονται στον Πίνακα IV.v.

Πίνακας IV.v. Τιμές της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων σε δείγματα ιστών του μαστού προβατίνων μετά τον ενοφθαλμισμό *M. haemolytica* στο θηλαίο πόρο τους.

	Χρονικό σημείο του πειραματισμού												
	D1 ^α			D3 ^α			D5 ^α			D7 ^α			
Υποομάδα (ημιμόριο)	Θηλή	Παρέγ- χυμα	Σύνολο	Θηλή	Παρέγ- χυμα	Σύνολο	Θηλή	Παρέγ- χυμα	Σύνολο	Θηλή	Παρέγ- χυμα	Σύνολο	Άθροι- σμα
A1 (ΦΜ+/ΠΜ+)	7	1	8	6	1	7	6	2	8	3	1	4	27
A2 (ΦΜ+/ΠΜ-)	2	0	2	2	0	2	1	1	2	1	1	2	8
B1 (ΦΜ+/ΠΜ+)	7	2	9	7	2	9	7	2	9	5	1	6	33
B2 (ΦΜ+/ΠΜ-)	1	0	1	2	0	2	2	1	3	1	1	2	8
Γ1 (ΦΜ+/ΠΜ+)	7	3	10	6	3	9	6	2	8	6	2	8	35
Γ2 (ΦΜ+/ΠΜ-)	1	0	1	2	1	3	1	0	1	1	0	1	6
Δ ^β (ΦΜ-/ΠΜ+)	7	1	8	6	2	8	6	4	10	7	3	10	36
A, B, Γ, Δ ^β (ΦΜ-/ΠΜ-)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

α. D1, D3, κ.λπ. = ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό.

β. Τα αποτελέσματα στην ομάδα Δ παρουσιάζουν τη διάμεση τιμή των ευρημάτων στα δύο ζώα, που θανατώθηκαν σε κάθε ημέρα ευθανασίας.

ΦΜ: φυσική μόλυνση, ΠΜ: πειραματική μόλυνση.

Γ. ΣΥΝΕΠΕΙΕΣ ΤΗΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΠΡΟΚΛΗΣΗΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΩΝ ΣΤΗ ΘΗΛΗ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΠΡΟΒΑΤΩΝ ΜΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΧΛΩΡΙΔΑ ΣΤΟ ΘΗΛΑΙΟ ΠΟΡΟ ΤΟΥΣ

Υλικά και μέθοδοι

Πειραματικός σχεδιασμός

Στον πειραματισμό χρησιμοποιήθηκαν 12 ενήλικες προβατίνες Καραγκούνικης φυλής (ηλικίας 3 έως 5 ετών), καθώς και 6 πρωτοτόκες προβατίνες, κατά τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου τους. Τα ζώα προέρχονταν από εκτροφή της περιοχής Καρδίτσας. Η διαχείριση των ζώων κατά τη διάρκεια του πειραματισμού ήταν όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο II, Τμήμα Β). Η επιλογή τους βασίστηκε στην ταυτόχρονη πλήρωση των πέντε κριτηρίων (α-ε), που έχουν ήδη περιγραφεί παραπάνω (Τμήμα Β), και στις τρεις δειγματοληψίες που έγιναν.

Ανάλογα με το είδος των μικροοργανισμών που απομονώθηκαν από το υλικό του θηλαίου πόρου, τα ζώα χωρίστηκαν στις παρακάτω ομάδες: ομάδα Ε (n=6) με ζώα από το θηλαίο πόρο των οποίων απομονώθηκαν πηκτάση-αρνητικοί σταφυλόκοκκοι (3 *S. epidermidis*, 3 *S. simulans*) σε μέτρια (+) ανάπτυξη και ομάδα ΣΤ (n=6) με ζώα από το θηλαίο πόρο των οποίων επίσης απομονώθηκαν πηκτάση-αρνητικοί σταφυλόκοκκοι (3 *S. epidermidis*, 3 *S. simulans*) σε μέτρια (+) ανάπτυξη. Στο δέρμα των δύο θηλών κάθε ζώου της ομάδας Ε προκλήθηκαν αλλοιώσεις, μετά από εμβάπτισή τους σε διάλυμα καυστικού νατρίου (Κεφάλαιο III, Τμήμα Γ). Η βαρύτητα των αλλοιώσεων βαθμολογήθηκε με "2" έως "3" στην κλίμακα των Fox και συν. (1991) (Πίνακας II.i). Οι προβατίνες της ομάδας ΣΤ χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες (δηλαδή, με βακτηριακή χλωρίδα στο θηλαίο πόρο). Κατά τη διάρκεια του πειραματισμού, τα πειραματόζωα αρμέγονταν, πάντοτε από το ίδιο άτομο, τρεις φορές καθημερινά.

Σε ό,τι αφορά στις πρωτοτόκες προβατίνες (ομάδα Ζ), από κανένα ζώο, δεν είχαν απομονωθεί βακτήρια από το υλικό του θηλαίου πόρου ή το γάλα, από τον τοκετό έως την έναρξη του πειραματισμού. Τα αρνιά τους απογαλακτίστηκαν τη 18η ημέρα μετά τον τοκετό. Στη συνέχεια, τα πειραματόζωα αρμέγονταν, πάντοτε από το ίδιο άτομο, τρεις φορές καθημερινά. Τότε, προκλήθηκαν αλλοιώσεις στο δέρμα της μίας μόνο θηλής του μαστού, εφαρμόζοντας την παραπάνω τεχνική, τέσσερις ημέρες αργότερα (22η ημέρα της γαλακτικής περιόδου). Τα ζώα

Κλινικά, βακτηριολογικά και κυτταρολογικά ευρήματα μετά την πρόκληση δερματικών αλλοιώσεων

Ομάδα Ε

Όλα τα ζώα παρουσίασαν γενικά κλινικά συμπτώματα (πυρετός έως 40,6 °C, ανορεξία, κατάπτωση, χλωρότητα) εντός 24 ωρών μετά την πρόκληση αλλοιώσεων στις θηλές του μαστού.

Θηλές του μαστού με βακτηριακή χλωρίδα, μετά από πρόκληση δερματικών αλλοιώσεων (ΦΜ+/Α+)

Σε όλα τα ζώα εκδηλώθηκε κλινική μαστίτιδα (έκκριμα ορώδες με πύγματα ή νιφάδες, αυξημένη θερμοκρασία και αυξημένο μέγεθος του μαστικού αδένος, ερυθρότητα του δέρματος του μαστού, σκληρότητα του παρεγχύματος, πόνος κατά την ψηλάφηση και δυσκολία στην άρμεξη) εντός 24 ωρών μετά την πρόκληση αλλοιώσεων.

Η εκάστοτε προϋπάρχουσα βακτηριακή χλωρίδα (όπως επιβεβαιώθηκε με τα αποτελέσματα της ταχείας δοκιμής API) απομονώθηκε από 71 από τα 72 δείγματα υλικού θηλαίου πόρου και μαστικού εκκρίματος.

Θετική αντίδραση (>"2") στη δοκιμή CMT παρατηρήθηκε την ημέρα D1 στα δείγματα μαστικού εκκρίματος όλων των ζώων. Συνολικά, θετική αντίδραση παρατηρήθηκε σε όλα τα δείγματα μαστικού εκκρίματος (36 από τα 36). Στα επιχρίσματα μαστικού εκκρίματος παρατηρήθηκαν αρχικά (μέχρι την ημέρα D2), κυρίως ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα (>80%) και σε μικρότερο ποσοστό μακροφάγα (10-20%). Στη συνέχεια, το ποσοστό των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων μειώθηκε (50-70%) και αντίστοιχα αυξήθηκε αυτό των μακροφάγων και των λεμφοκυττάρων (20-40% και 10-20%, αντίστοιχα).

Θηλές του μαστού χωρίς βακτηριακή χλωρίδα, μετά από πρόκληση δερματικών αλλοιώσεων (ΦΜ-/Α+)

Καμία προβατίνα δεν εκδήλωσε κλινική ή υποκλινική μαστίτιδα.

Από κανένα δείγμα υλικού θηλαίου πόρου ή γάλακτος δεν απομονώθηκαν βακτήρια.

Θετική αντίδραση ("1" - "2") στη δοκιμή CMT παρατηρήθηκε σε όλα τα δείγματα γάλακτος. Στα επιχρίσματα γάλακτος παρατηρήθηκαν ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα και μακροφάγα (90% και 10%, αντίστοιχα).

Ομάδα ΣΤ

Κανένα ζώο δεν εκδήλωσε γενικά κλινικά συμπτώματα στη διάρκεια του πειραματισμού.

Θηλές του μαστού με βακτηριακή χλωρίδα, χωρίς παρέμβαση (ΦΜ+/Α-)

Καμία προβατίνα δεν εκδήλωσε κλινική ή υποκλινική μαστίτιδα.

Η εκάστοτε προϋπάρχουσα βακτηριακή χλωρίδα (όπως επιβεβαιώθηκε με τα αποτελέσματα της ταχείας δοκιμής API) απομονώθηκε από 36 από τα 72 δείγματα υλικού θηλαίου πόρου και γάλακτος.

Σε όλα τα δείγματα γάλακτος, παρατηρήθηκε αρνητική αντίδραση (<"1") στη δοκιμή CMT. Στα επιχρίσματα γάλακτος παρατηρήθηκαν περιστασιακά λίγα μακροφάγα.

Θηλές του μαστού χωρίς βακτηριακή χλωρίδα, χωρίς παρέμβαση (ΦΜ-/Α-)

Καμία προβατίνα δεν εκδήλωσε κλινική ή υποκλινική μαστίτιδα.

Από κανένα δείγμα υλικού θηλαίου πόρου ή γάλακτος δεν απομονώθηκαν βακτήρια.

Σε όλα τα δείγματα γάλακτος, παρατηρήθηκε αρνητική αντίδραση (<"1") στη δοκιμή CMT. Στα επιχρίσματα γάλακτος δεν παρατηρήθηκαν λευκοκύτταρα.

Ομάδα Ζ

Κανένα ζώο δεν εκδήλωσε γενικά κλινικά συμπτώματα στη διάρκεια του πειραματισμού.

Θηλές του μαστού χωρίς βακτηριακή χλωρίδα, μετά από πρόκληση δερματικών αλλοιώσεων (ΦΜ-/Α+)

Καμία προβατίνα δεν εκδήλωσε κλινική ή υποκλινική μαστίτιδα.

Από κανένα δείγμα υλικού θηλαίου πόρου ή γάλακτος δεν απομονώθηκαν βακτήρια.

Θετική αντίδραση ("1"- "2") στη δοκιμή CMT παρατηρήθηκε σε όλα τα δείγματα γάλακτος. Στα επιχρίσματα γάλακτος παρατηρήθηκαν ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα και μακροφάγα (90% και 10%, αντίστοιχα).

Θηλές του μαστού χωρίς βακτηριακή χλωρίδα, χωρίς παρέμβαση (ΦΜ-/Α-)

Καμία προβατίνα δεν εκδήλωσε κλινική ή υποκλινική μαστίτιδα.

Από κανένα δείγμα υλικού θηλαίου πόρου ή γάλακτος δεν απομονώθηκαν βακτήρια.

Σε όλα τα δείγματα γάλακτος, παρατηρήθηκε αρνητική αντίδραση (<"1") στη δοκιμή CMT. Στα επιχρίσματα γάλακτος δεν παρατηρήθηκαν λευκοκύτταρα.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα IV.vi.

Η στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων παρουσιάζεται στον Πίνακα IV.vii.

Πίνακας IV.vi. Βακτηριολογικά ευρήματα (απομόνωση βακτηριακής χλωρίδας) και αποτελέσματα της δοκιμής CMT μετά την πρόκληση αλλοιώσεων στη θηλή του μαστού προβατίνων με προϋπάρχουσα βακτηριακή χλωρίδα στο θηλαίο πόρο.

	Χρονικό σημείο του πειραματισμού / Ομάδες											
	D1 ^α			D2 ^α			D3 ^α			D4 ^α		
	E	ΣΤ	Z	E	ΣΤ	Z	E	ΣΤ	Z	E	ΣΤ	Z
Απομόνωση βακτηρίων												
ΘΠ - βχ ^β	6/6	6/6	0/6	6/6	6/6	0/6	6/6	6/6	0/6	6/6	6/6	0/6
ΜΕ - βχ ^β	5/6	0/6	0/6	6/6	0/6	0/6	6/6	0/6	0/6	6/6	0/6	0/6
Αποτελέσματα δοκιμής CMT												
Θετική αντίδραση (≥"1")	6/6	0/6	6/6	6/6	0/6	6/6	6/6	0/6	6/6	6/6	0/6	6/6
	D5 ^α			D6 ^α			D7 ^α			Σύνολο		
	E	ΣΤ	Z	E	ΣΤ	Z	E	ΣΤ	Z	E	ΣΤ	Z
Απομόνωση βακτηρίων												
ΘΠ - βχ ^β	6/6	6/6	0/6	3/3	3/3	0/3	3/3	3/3	0/3	36/36	36/36	0/36
ΜΕ - βχ ^β	6/6	0/6	0/6	3/3	0/3	0/3	3/3	0/3	0/3	35/36	0/36	0/36
Αποτελέσματα δοκιμής CMT												
Θετική αντίδραση (≥"1")	6/6	0/6	5/6	3/3	0/3	2/3	3/3	0/3	1/3	36/36	0/36	32/36

α. D1, D2, κ.λπ. = ημέρα μετά την πρόκληση αλλοιώσεων.

β. ΘΠ - βχ = θηλαίος πόρος - βακτηριακή χλωρίδα, ΜΕ - βχ = μαστικό έκκριμα - βακτηριακή χλωρίδα.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως n/m=θετικά αποτελέσματα στο σύνολο των δειγμάτων που ελήφθησαν.

Πίνακας IV.vii. Στατιστική σημαντικότητα ($P=$) των διαφορών των αποτελεσμάτων της βακτηριολογικής εξέτασης και των αποτελεσμάτων της δοκιμής CMT μεταξύ των διαφόρων ομάδων, μετά την πρόκληση δερματικών αλλοιώσεων σε θηλές του μαστού προβατίνων με προϋπάρχουσα βακτηριακή χλωρίδα στο θηλαίο πόρο.

Σύγκριση μεταξύ	Αποτελέσματα βακτηριολογικής εξέτασης		Αποτελέσματα δοκιμής CMT
	ΘΠ - βχ ^α	ΜΕ - βχ ^α	
Ε - ΣΤ	1,00	<0,001	<0,001
Ε - Ζ	<0,001	<0,001	0,11
ΣΤ - Ζ	<0,001	1,00	<0,001

α. ΘΠ - βχ = θηλαίος πόρος - βακτηριακή χλωρίδα, ΜΕ - βχ = μαστικό έκκριμα - βακτηριακή χλωρίδα.

Παθολογοανατομικά ευρήματα

Βακτηριολογικά ευρήματα στα δείγματα ιστών

Ομάδα Ε

Θηλές του μαστού με βακτηριακή χλωρίδα, μετά από πρόκληση δερματικών αλλοιώσεων (**ΦΜ+/Α+**)

Η προϋπάρχουσα βακτηριακή χλωρίδα (όπως επιβεβαιώθηκε με τα αποτελέσματα της ταχείας δοκιμής API) απομονώθηκε από όλα τα δείγματα από τις θηλές και το μαστικό παρέγχυμα (18 από τα 18).

Θηλές του μαστού χωρίς βακτηριακή χλωρίδα, μετά από πρόκληση δερματικών αλλοιώσεων (**ΦΜ-/Α+**)

Δεν απομονώθηκαν βακτήρια από κανένα δείγμα θηλής ή μαστικού παρεγχύματος.

Ομάδα ΣΤ

Θηλές του μαστού με βακτηριακή χλωρίδα, χωρίς παρέμβαση (**ΦΜ+/Α-**)

Η προϋπάρχουσα βακτηριακή χλωρίδα (όπως επιβεβαιώθηκε με τα αποτελέσματα της ταχείας δοκιμής API) απομονώθηκε από δείγματα από τις θηλές όλων των ζώων, αλλά όχι από τα δείγματα του μαστικού παρεγχύματος (συνολικά, από 6 από τα 18 δείγματα).

Θηλές του μαστού χωρίς βακτηριακή χλωρίδα, χωρίς παρέμβαση (**ΦΜ-/Α-**)

Δεν απομονώθηκαν βακτήρια από κανένα δείγμα θηλής ή μαστικού παρεγχύματος.

Ομάδα Z

Θηλής του μαστού χωρίς βακτηριακή χλωρίδα, μετά από πρόκληση δερματικών αλλοιώσεων (**ΦΜ-/Α+**)

Δεν απομονώθηκαν βακτήρια από κανένα δείγμα θηλής ή μαστικού παρεγχύματος.

Θηλής του μαστού χωρίς βακτηριακή χλωρίδα, χωρίς παρέμβαση (**ΦΜ-/Α-**)

Δεν απομονώθηκαν βακτήρια από κανένα δείγμα θηλής ή μαστικού παρεγχύματος.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα IV.viii.

Πίνακας IV.viii. Βακτηριολογικά ευρήματα (απομόνωση βακτηριακής χλωρίδας) σε δείγματα ιστών μετά την πρόκληση δερματικών αλλοιώσεων στη θηλή του μαστού προβατίνων με προϋπάρχουσα βακτηριακή χλωρίδα στο θηλαίο πόρο τους.

	Χρονικό σημείο του πειραματισμού / Ομάδες					
	D5 ^α			D7 ^α		
	E	ΣΤ	Z	E	ΣΤ	Z
ΘΠ - βχ ^β	3/3 ^β	3/3	0/3	3/3	3/3	0/3
ΘΚ - βχ ^β	3/3	0/3	0/3	3/3	0/3	0/3
ΜΠ - βχ ^β	3/3	0/3	0/3	3/3	0/3	0/3

α. D5, D7 = ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό.

β. ΘΠ - βχ = θηλαίος πόρος - βακτηριακή χλωρίδα, ΘΚ - βχ = θηλαίος κόλπος - βακτηριακή χλωρίδα, ΜΠ - βχ = μαστικό παρέγχυμα - βακτηριακή χλωρίδα.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως n/m=θετικά αποτελέσματα στο σύνολο των δειγμάτων που ελήφθησαν.

Μακροσκοπικά νεκροτομικά και ιστοπαθολογικά ευρήματα

Ομάδα Ε

Θηλής του μαστού με βακτηριακή χλωρίδα, μετά από πρόκληση δερματικών αλλοιώσεων (**ΦΜ+/Α+**)

Η εσωτερική επιφάνεια της θηλής είχε πολλές πτυχωσεις, υπεραιμία και πάχυνση του βλεννογόνου. Στο δέρμα της θηλής μακροσκοπικά παρατηρήθηκαν έλκη, διάβρωση και εφελκίδες. Το κύριο ιστοπαθολογικό εύρημα ήταν η έντονη διήθηση του επιθηλίου από ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα. Παρατηρήθηκαν λεμφοκύτταρα και πλασμοκύτταρα, καθώς και λύση ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων. Παρατηρήθηκαν συναθροίσεις λεμφοκυττάρων με εικόνα χαρακτηριστική θυλακίου, με ή χωρίς ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα και βλαστική δραστηριότητα, στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου. Ήταν χαρακτηριστική η παρουσία μεγάλου αριθμού ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων στο χόριο. Οι δερματικές αλλοιώσεις δεν επεκτείνονταν έως το εσωτερικό της θηλής, δηλαδή στο θηλαίο πόρο ή το

θηλαίο κόλπο, καθώς το μέγιστο βάθος τους ήταν έως 2 mm, οι δε υποκείμενοι ιστοί ήταν άθικτοι.

Στο μαστικό παρέγχυμα παρατηρήθηκαν υποδόριο οίδημα και περιοχές με αιμορραγίες. Επίσης, παρατηρήθηκαν συμφόρηση και διάταση των αγγείων. Στους γαλακτοφόρους πόρους υπήρχαν πηγμένα γάλακτος και ινική. Οι γαλακτοφόροι πόροι και ο γαλακτοφόρος κόλπος περιείχαν συσσωματώματα εξιδρώματος, ινική και θρόμβους αίματος. Τα επιχώρια λεμφογάγγλια ήταν έντονα διογκωμένα και οίδηματικά. Τα ιστοπαθολογικά ευρήματα περιλάμβαναν έντονη διήθηση από ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα, ρήξη αγγείων, αιμορραγίες, λύση των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων και καταστροφή των επιθηλιακών κυττάρων των αδενοκυψελών.

Η τιμή της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων (άθροισμα των διάμεσων τιμών στα δύο χρονικά σημεία ευθανασίας) ήταν 28 (μέγιστη δυνατή τιμή: 32).

Θηλής του μαστού χωρίς βακτηριακή χλωρίδα, μετά από πρόκληση δερματικών αλλοιώσεων (**ΦΜ-/Α+**)

Σε καμία από αυτές τις θηλές και το σύστοιχο μαστικό παρέγχυμα δεν υπήρχαν παθολογοανατομικά ευρήματα, άλλα από αυτά που σχετίζονταν με τις δερματικές αλλοιώσεις. Σε γενικές γραμμές, αυτά ήταν όμοια με εκείνα που περιγράφηκαν για τις ετερόπλευρες θηλές.

Η τιμή της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων (άθροισμα των διάμεσων τιμών στα δύο χρονικά σημεία ευθανασίας) ήταν 14 (μέγιστη δυνατή τιμή: 32).

Ομάδα ΣΤ

Θηλής του μαστού με βακτηριακή χλωρίδα, χωρίς παρέμβαση (**ΦΜ+/Α-**)

Σε γενικές γραμμές, τα μακροσκοπικά νεκροτομικά και τα ιστοπαθολογικά ευρήματα ήταν παρόμοια με αυτά που περιγράφηκαν παραπάνω [υποομάδες Α2, Β2, Γ2 - θηλής του μαστού με βακτηριακή χλωρίδα, μη ενοφθαλμισμένες (**ΦΜ+/ΠΜ-**)].

Η τιμή της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων (άθροισμα των διάμεσων τιμών στα δύο χρονικά σημεία ευθανασίας) ήταν 3 (μέγιστη δυνατή τιμή: 32).

Θηλής του μαστού χωρίς βακτηριακή χλωρίδα, χωρίς παρέμβαση (**ΦΜ-/Α-**)

Σε καμία από αυτές τις θηλές και το σύστοιχο μαστικό παρέγχυμα δεν υπήρχαν παθολογοανατομικά ευρήματα.

Η τιμή της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων (άθροισμα των διάμεσων τιμών στα δύο χρονικά σημεία ευθανασίας) ήταν 0 (μέγιστη δυνατή τιμή: 32).

Ομάδα Z

Θηλής του μαστού χωρίς βακτηριακή χλωρίδα, μετά από πρόκληση δερματικών αλλοιώσεων (**ΦM-/A+**)

Σε γενικές γραμμές, τα μακροσκοπικά νεκροτομικά και τα ιστοπαθολογικά ευρήματα ήταν παρόμοια με αυτά που περιγράφηκαν παραπάνω [ομάδα E - θηλής χωρίς βακτηριακή χλωρίδα, μετά από πρόκληση δερματικών αλλοιώσεων (**ΦM-/A+**)].

Η τιμή της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων (άθροισμα των διάμεσων τιμών στα δύο χρονικά σημεία ευθανασίας) ήταν 14 (μέγιστη δυνατή τιμή: 32).

Θηλής του μαστού χωρίς βακτηριακή χλωρίδα, χωρίς παρέμβαση (**ΦM-/A-**)

Σε καμία από αυτές τις θηλές και το σύστοιχο μαστικό παρέγχυμα δεν υπήρχαν παθολογοανατομικά ευρήματα.

Η τιμή της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων (άθροισμα των διάμεσων τιμών στα δύο χρονικά σημεία ευθανασίας) ήταν 0 (μέγιστη δυνατή τιμή: 32).

Αναλυτικά αποτελέσματα των τιμών στην κλίμακα βαθμολόγησης των παθολογοανατομικών ευρημάτων παρουσιάζονται στον Πίνακα IV.ix.

Πίνακας IV.ix. Τιμές^a της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων σε δείγματα ιστών του μαστού προβατίνων μετά την πρόκληση αλλοιώσεων σε θηλής του μαστού με προϋπάρχουσα βακτηριακή χλωρίδα.

	Χρονικό σημείο του πειραματισμού						
	D5			D7			
Ομάδα (ημιμόριο)	Θηλή	Παρέγ- χυμα	Σύνολο	Θηλή	Παρέγ- χυμα	Σύνολο	Άθροισμα
E (ΦΜ+/Α+)	7	7	14	6	8	14	28
E (ΦΜ-/Α+)	6	2	8	5	1	6	14
ΣΤ (ΦΜ+/Α-)	1	1	2	1	0	1	3
ΣΤ (ΦΜ-/Α-)	0	0	0	0	0	0	0
Z (ΦΜ-/Α+)	6	1	7	6	1	7	14
Z (ΦΜ-/Α-)	0	0	0	0	0	0	0

α. Τα αποτελέσματα σε κάθε ομάδα παρουσιάζουν τη διάμεση τιμή των ευρημάτων στα τρία ζώα, που θανατώθηκαν στο συγκεκριμένο χρονικό σημείο του πειραματισμού.

ομάδα Θ: ένα ημιμόριο: θηλή **ΦΜ-/ΠΜ-**, μαστικός αδένας **ΦΜ-/ΠΜ+**,
ετερόπλευρο ημιμόριο: θηλή **ΦΜ-/ΠΜ-**, αδένας **ΦΜ-/ΠΜ-**
Ο πειραματικός σχεδιασμός συνοψίζεται στον Πίνακα IV.i.

Εξετάσεις πριν και μετά τον ενοφθαλμισμό

Πραγματοποιούνταν κλινική εξέταση των ζώων και λαμβάνονταν δείγματα υλικού θηλαίου πόρου και γάλακτος, όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο III, Τμήμα Β), για βακτηριολογική και κυτταρολογική εξέταση. Επίσης, έγινε παθολογοανατομική εξέταση (μακροσκοπική νεκροτομική και ιστοπαθολογική εξέταση) μετά από ευθανασία των ζώων, όπως περιγράφηκε παραπάνω (Τμήμα Β), στα χρονικά σημεία που αναφέρονται στον Πίνακα IV.i. Σε όλα τα στελέχη πηκτάση-αρνητικών σταφυλοκόκκων εφαρμόστηκαν η ταχεία δοκιμή "API-Staph SYSTEM" και μία πλήρης σειρά βιοχημικών δοκιμών. Έτσι έγινε δυνατή η σύγκριση των βιοχημικών αποτελεσμάτων της εξέτασης των βακτηριακών στελεχών.

Η εκτίμηση και η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγιναν όπως περιγράφηκε παραπάνω (Τμήμα Β).

Αποτελέσματα

Ευρήματα πριν τον ενοφθαλμισμό

Όλες οι προβατίνες ήταν κλινικά υγιείς πριν τον ενοφθαλμισμό τους. Οι θηλές του μαστού ήταν μαλακές, χωρίς αλλοιώσεις. Δεν απομονώθηκαν βακτήρια από το υλικό θηλαίου πόρου και από το γάλα. Η αντίδραση της δοκιμής CMT ήταν αρνητική (<"1") σε όλα τα δείγματα. Στα επιχρίσματα γάλακτος δεν παρατηρήθηκαν λευκοκύτταρα.

Κλινικά, βακτηριολογικά και κυτταρολογικά ευρήματα μετά τον ενοφθαλμισμό

Ομάδα Η

Κανένα ζώο δεν παρουσίασε γενικά κλινικά συμπτώματα στη διάρκεια του πειραματισμού.

Ημιμόριο του μαστού με ενοφθαλμισμένη θηλή (θηλή ΦΜ-/ΠΜ+, μαστικός αδένας ΦΜ-/ΠΜ-)

Σε όλα τα ζώα διαπιστώθηκε παροδική (ημέρα D2 έως ημέρα D3) ύπαρξη παθολογικού μαστικού εκκρίματος, το οποίο ήταν ορώδες και περιείχε νιφάδες. Οι θηλές ήταν σκληρές και η έξοδος του γάλακτος ήταν δύσκολη.

S. simulans (όπως επιβεβαιώθηκε με τα αποτελέσματα της ταχείας δοκιμής API) απομονώθηκε από 38 από τα 48 δείγματα υλικού θηλαίου πόρου και μαστικού εκκρίματος.

Θετική αντίδραση (>"2") στη δοκιμή CMT παρατηρήθηκε την ημέρα D1 στα δείγματα όλων των ζώων. Στα επιχρίσματα μαστικού εκκρίματος παρατηρήθηκαν κόκκοι και λευκοκύτταρα. Αρχικά (μέχρι την ημέρα D2), τα περισσότερα (80-90%) ήταν ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα. Στη συνέχεια, το ποσοστό των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων μειώθηκε (30-60%) και αντίστοιχα αυξήθηκε αυτό των μακροφάγων και των λεμφοκυττάρων (15-40% και 10-40%, αντίστοιχα).

Ημιμόριο του μαστού όπου δεν έγινε ενοφθαλμισμός (θηλή και μαστικός αδένας ΦΜ-/ΠΜ-)

Καμία προβατίνα δεν εκδήλωσε κλινική ή υποκλινική μαστίτιδα.

Από κανένα δείγμα υλικού θηλαίου πόρου ή γάλακτος δεν απομονώθηκαν βακτήρια.

Σε όλα τα δείγματα γάλακτος, παρατηρήθηκε αρνητική (<"1") αντίδραση στη δοκιμή CMT.

Ομάδα Θ

Όλα τα ζώα παρουσίασαν γενικά κλινικά συμπτώματα εντός 24 ωρών μετά τον ενοφθαλμισμό: πυρετό (έως 40,2 °C) και κατάπτωση.

Ημιμόριο του μαστού όπου ενοφθαλμίστηκε ο μαστικός αδένας (θηλή ΦΜ-/ΠΜ-, μαστικός αδένας ΦΜ-/ΠΜ+)

Σε όλα τα ζώα εκδηλώθηκε κλινική μαστίτιδα (έκκριμα ορώδες με πύργα ή νιφάδες, αυξημένη θερμοκρασία και αυξημένο μέγεθος του μαστικού αδένα, σκληρότητα του παρεγχύματος, πόνος κατά την ψηλάφηση και δυσκολία στην άρμεξη). Οι θηλές ήταν φυσιολογικές.

S. simulans (όπως επιβεβαιώθηκε από τα αποτελέσματα της ταχείας δοκιμής API) απομονώθηκε από 28 από τα 48 δείγματα υλικού θηλαίου πόρου και μαστικού εκκρίματος.

Θετική αντίδραση (>"2") στη δοκιμή CMT παρατηρήθηκε την ημέρα D1 στα δείγματα όλων των ζώων. Στα επιχρίσματα μαστικού εκκρίματος παρατηρήθηκαν κόκκοι και λευκοκύτταρα. Αρχικά (μέχρι την ημέρα D2), τα περισσότερα (90-100%) ήταν ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα. Στη συνέχεια, το ποσοστό των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων μειώθηκε (40-

70%) και αντίστοιχα αυξήθηκε αυτό των μακροφάγων και των λεμφοκυττάρων (10-35% και 10-30%, αντίστοιχα).

Ημιμόριο του μαστού όπου δεν έγινε ενοφθαλμισμός (θηλή και μαστικός αδένας ΦΜ-/ΠΜ-)

Καμία προβατίνα δεν εκδήλωσε κλινική ή υποκλινική μαστίτιδα.
Από κανένα δείγμα υλικού θηλαίου πόρου ή γάλακτος δεν απομονώθηκαν βακτήρια.
Σε όλα τα δείγματα γάλακτος, παρατηρήθηκε αρνητική (<"1") αντίδραση στη δοκιμή CMT.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα IV.x.

Η στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων παρουσιάζεται στον Πίνακα IV.xi.

Πίνακας IV.χ. Βακτηριολογικά ευρήματα (απομόνωση *S. simulans*) και αποτελέσματα της δοκιμής CMT μετά τον ενοφθαλμισμό *S. simulans* στο θηλαίο πόρο ή στο γαλακτοφόρο κόλπο προβατίνων.

	Χρονικό σημείο μετά τον ενοφθαλμισμό / Ομάδες									
	D1 ^α		D2 ^α		D3 ^α		D4 ^α		D5 ^α	
	Η	Θ	Η	Θ	Η	Θ	Η	Θ	Η	Θ
Απομόνωση <i>S. simulans</i>										
ΘΠ - βχ ^β	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
ΘΠ - Ss ^β	4/4	0/4	4/4	0/4	4/4	1/4	4/4	1/4	3/4	1/4
ΓΑ - βχ ^β	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
ΓΑ - Ss ^β	1/4	4/4	2/4	4/4	3/4	4/4	3/4	4/4	3/4	4/4
Αποτελέσματα δοκιμής CMT										
Θετική αντίδραση (≥"1")	2/4	4/4	3/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
	D6 ^α		D7 ^α		Σύνολο					
	Η	Θ	Η	Θ	Η		Θ			
Απομόνωση <i>S. simulans</i>										
ΘΠ - βχ ^β	0/2	0/2	0/2	0/2	0/24		0/24			
ΘΠ - Ss ^β	2/2	0/2	1/2	1/2	22/24		4/24			
ΓΑ - βχ ^β	0/2	0/2	0/2	0/2	0/24		0/24			
ΓΑ - Ss ^β	2/2	2/2	2/2	2/2	16/24		24/24			
Αποτελέσματα δοκιμής CMT										
Θετική αντίδραση (≥"1")	1/2	2/2	1/2	2/2	19/24		24/24			

α. D1, D2, κ.λπ. = ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό.

β. ΘΠ - βχ = θηλαίος πόρος - βακτηριακή χλωρίδα, ΘΠ - Ss = θηλαίος πόρος - *S. simulans*, ΓΑ - βχ = γάλα - βακτηριακή χλωρίδα, ΓΑ - Ss = γάλα - *S. simulans*.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως n/m=θετικά αποτελέσματα στο σύνολο των δειγμάτων που ελήφθησαν.

Πίνακας IV.xi. Στατιστική σημαντικότητα ($P=$) των αποτελεσμάτων της βακτηριολογικής εξέτασης και των αποτελεσμάτων της δοκιμής CMT μετά τον ενοφθαλμισμό *S. simulans* στο θηλαίο πόρο ή το γαλακτοφόρο κόλπο προβατίνων.

Σύγκριση μεταξύ	Απομόνωση βακτηρίων				Αντίδραση δοκιμής CMT
	ΘΠ - βχ ^α	ΘΠ - Ss ^α	ΓΑ - βχ ^α	ΓΑ - Ss ^α	
Θ - Η	1,00	<0,001	1,00	<0,004	0,049

α. ΘΠ - βχ = θηλαίος πόρος - βακτηριακή χλωρίδα, ΘΠ - Ss = θηλαίος πόρος - *S. simulans*, ME - βχ = γάλα - βακτηριακή χλωρίδα, ME - Ss = γάλα - *S. simulans*.

Παθολογοανατομικά ευρήματα

Βακτηριολογικά ευρήματα στα δείγματα ιστών

Ομάδα Η

Ημιμόριο του μαστού με ενοφθαλμισμένη θηλή (θηλή **ΦΜ-/ΠΜ+**, μαστικός αδένας **ΦΜ-/ΠΜ-**)

S. simulans (όπως επιβεβαιώθηκε με τα αποτελέσματα της ταχείας δοκιμής API-Staph) απομονώθηκε σε καθαρή καλλιέργεια από 7 από τα 12 δείγματα θηλής και μαστικού παρεγχύματος.

Ημιμόριο του μαστού όπου δεν έγινε ενοφθαλμισμός (θηλή και μαστικός αδένας **ΦΜ-/ΠΜ-**)

Δεν απομονώθηκαν βακτήρια από κανένα δείγμα θηλής ή μαστικού παρεγχύματος.

Ομάδα Θ

Ημιμόριο του μαστού όπου ενοφθαλμίστηκε ο αδένας (θηλή **ΦΜ-/ΠΜ-**, μαστικός αδένας **ΦΜ-/ΠΜ+**)

S. simulans (όπως επιβεβαιώθηκε με τα αποτελέσματα της ταχείας δοκιμής API-Staph) απομονώθηκε σε καθαρή καλλιέργεια από 9 από τα 12 δείγματα θηλής και μαστικού παρεγχύματος.

Ημιμόριο του μαστού όπου δεν έγινε ενοφθαλμισμός (θηλή και μαστικός αδένας **ΦΜ-/ΠΜ-**)

Δεν απομονώθηκαν βακτήρια από κανένα δείγμα θηλής ή μαστικού παρεγχύματος.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα IV.xii.

Πίνακας IV.xii. Βακτηριολογικά ευρήματα (απομόνωση *S. simulans*) σε δείγματα ιστών μετά τον ενοφθαλμισμό *S. simulans* στο θηλαίο πόρο ή το γαλακτοφόρο κόλπο προβατίνων.

	Χρονικό σημείο του πειραματισμού / Ομάδες			
	D5 ^α		D7 ^α	
	Η	Θ	Η	Θ
ΘΠ - Ss ^β	2/2	1/2	1/2	0/2
ΘΚ - Ss ^β	2/2	2/2	1/2	2/2
ΜΠ - Ss ^β	1/2	2/2	0/2	2/2

α. D5, D7 = ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό.

β. ΘΠ - Ss = θηλαίος πόρος - *S. simulans*, ΘΚ - Ss = θηλαίος κόλπος - *S. simulans*, ΜΠ - Ss = μαστικό παρέγχυμα - *S. simulans*.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως n/m=θετικά αποτελέσματα στο σύνολο των δειγμάτων που ελήφθησαν.

Μακροσκοπικά νεκροτομικά και ιστοπαθολογικά ευρήματα

Ομάδα Η

Ημιμόριο του μαστού με ενοφθαλμισμένη θηλή (θηλή **ΦΜ-/ΠΜ+**, μαστικός αδένας **ΦΜ-/ΠΜ-**)

Από τη σύγκριση του μήκους του αυλού της θηλής με το μήκος του χρησιμοποιούμενου για τον ενοφθαλμισμό καθετήρα, επιβεβαιώθηκε ότι το ενοφθάλμισμα είχε τοποθετηθεί στο θηλαίο πόρο.

Παρατηρήθηκαν ήπιες αλλοιώσεις (πτυχώσεις, πάχυνση του βλεννογόνου και πετέχειες στο θηλαίο πόρο) στις θηλές αυτών των ζώων. Σε ένα ζώο, στο οποίο έγινε ευθανασία την ημέρα D7, παρατηρήθηκε έντονη πάχυνση του βλεννογόνου και συνακόλουθη στένωση του αυλού της θηλής. Το κύριο ιστοπαθολογικό εύρημα ήταν η διήθηση του επιθηλίου από λευκοκύτταρα (ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα, λεμφοκύτταρα, πλασμοκύτταρα), πιο έντονη στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου. Σε κάποιες θηλές, παρατηρήθηκαν συναθροίσεις λεμφοκυττάρων με εικόνα χαρακτηριστική θυλακίου, με ή χωρίς ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα και βλαστική δραστηριότητα, στο σημείο εκείνο.

Στο μαστικό παρέγχυμα και τα επιχώρια λεμφογάγγλια δεν παρατηρήθηκαν μακροσκοπικά νεκροτομικά παθολογικά ευρήματα. Τα ιστοπαθολογικά ευρήματα περιλάμβαναν διήθηση από ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα, ρήξη αγγείων, λύση των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων και καταστροφή των επιθηλιακών κυττάρων των αδενοκυψελών.

Η τιμή της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων (άθροισμα των διαμέσων τιμών στα δύο χρονικά σημεία ευθανασίας) ήταν 22 (μέγιστη δυνατή τιμή: 32).

Ημιμόριο του μαστού όπου δεν έγινε ενοφθαλμισμός (θηλή και μαστικός αδένας **ΦΜ-/ΠΜ-**)

Σε κανένα από αυτά τα ημιμόρια δεν υπήρχαν παθολογοανατομικά ευρήματα.

Η τιμή της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων (άθροισμα των διαμέσων τιμών στα δύο χρονικά σημεία ευθανασίας) ήταν 0 (μέγιστη δυνατή τιμή: 32).

Ομάδα Θ

Ημιμόριο του μαστού όπου ενοφθαλμίστηκε ο αδένας (θηλή **ΦΜ-/ΠΜ-**, μαστικός αδένας **ΦΜ-/ΠΜ+**)

Σε καμία από αυτές τις θηλές δεν υπήρχαν μακροσκοπικά παθολογοανατομικά ευρήματα. Σε κάποια ζώα παρατηρήθηκε ιστολογικά, ήπια λευκοκυτταρική διήθηση του επιθηλίου.

Στο μαστικό παρέγχυμα παρατηρήθηκαν υποδόριο οίδημα και οροαιμορραγικό εξίδρωμα. Στους γαλακτοφόρους πόρους υπήρχαν πρήγματα γάλακτος και ινική. Τα επιχώρια λεμφογάγγλια ήταν διογκωμένα και οιδηματικά. Τα ιστοπαθολογικά ευρήματα περιλάμβαναν έντονη διήθηση από ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα, ρήξη αγγείων και καταστροφή των επιθηλιακών κυττάρων των αδενοκυψελών.

Η τιμή της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων (άθροισμα των διαμέσων τιμών στα δύο χρονικά σημεία ευθανασίας) ήταν 16 (μέγιστη δυνατή τιμή: 32).

Ημιμόριο του μαστού όπου δεν έγινε ενοφθαλμισμός (θηλή και μαστικός αδένας **ΦΜ-/ΠΜ-**)

Σε καμία από αυτές τις θηλές και το σύστοιχο μαστικό παρέγχυμα δεν υπήρχαν παθολογοανατομικά ευρήματα.

Η τιμή της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων (άθροισμα των διαμέσων τιμών στα δύο χρονικά σημεία ευθανασίας) ήταν 0 (μέγιστη δυνατή τιμή: 32).

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα IV.xiii.

Πίνακας IV.xiii. Τιμές^α της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων σε δείγματα ιστών του μαστού προβατίνων μετά τον ενοφθαλμισμό *S. simulans* στο θηλαίο πόρο ή το γαλακτοφόρο κόλπο τους.

	Χρονικό σημείο πειραματισμού						
	D5			D7			
Ομάδα (θηλή / μαστικός αδένας)	Θηλή	Παρέγ- χυμα	Σύνολο	Θηλή	Παρέγ- χυμα	Σύνολο	Άθροισμα
H (ΦΜ-/ΠΜ+ / ΦΜ-/ΠΜ-)	7	3,5	10,5	7,5	4	11,5	22
H (ΦΜ-/ΠΜ- / ΦΜ-/ΠΜ-)	0	0	0	0	0	0	0
Θ (ΦΜ-/ΠΜ- / ΦΜ-/ΠΜ+)	0,5	7,5	8	0,5	7,5	8	16
Θ (ΦΜ-/ΠΜ- / ΦΜ-/ΠΜ-)	0	0	0	0	0	0	0

α. Τα αποτελέσματα σε κάθε ομάδα παρουσιάζουν τη διάμεση τιμή των ευρημάτων στα τέσσερα ζώα, που θανατώθηκαν σε κάθε ημέρα ευθανασίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ V

ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΣΕ ΘΗΛΕΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΚΛΙΝΙΚΑ ΥΓΙΩΝ ΑΜΝΑΔΩΝ

Εισαγωγή

Σε προηγούμενες μελέτες (Μανρογιάννη και συν. 2005, Μαυρογιάννη 2006, Μαυρογιάννη, Cripps και συν. 2007), καθώς και σε προηγούμενους πειραματισμούς της παρούσας διατριβής, παρατηρήθηκαν συναθροίσεις λεμφοκυττάρων με εικόνα χαρακτηριστική θυλακίου στις θηλές του μαστού των προβατίνων, συγκεκριμένα δε στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου. Το σύνολο των ευρημάτων υπογραμμίζει τη σημασία αυτού του σχηματισμού για την άμυνα του μαστού. Όμως, όλα τα προηγούμενα ευρήματα αφορούσαν σε ενήλικες προβατίνες, δηλαδή ζώα των οποίων οι μαστικοί αδένες βρίσκονταν ήδη σε γαλακτοπαραγωγή. Στο κεφάλαιο αυτό, παρουσιάζονται τα ιστολογικά ευρήματα σε θηλές του μαστού αμνάδων, ιδιαίτερα δε η ενδεχόμενη παρουσία σχηματισμού λεμφοειδούς τύπου.

Υλικά και Μέθοδοι

Συλλογή και επεξεργασία δειγμάτων

Εξετάστηκαν 24 θηλές του μαστού από 12 αμνάδες Καραγκούνικης φυλής, δηλαδή και οι δύο θηλές κάθε ζώου. Τα ζώα ήταν ηλικίας 4 έως 5 μηνών και δεν είχαν εκδηλώσει αναπαραγωγική δραστηριότητα. Τα δείγματα συλλέχθηκαν σε σφαγείο του νομού Τρικάλων.

Η συλλογή των θηλών έγινε αμέσως μετά τη σφαγή των ζώων. Αυτές εξετάστηκαν με επισκόπηση και ψηλαφήθηκαν σε όλην την έκτασή τους. Στη συνέχεια, έγινε θηλεκτομή στη βάση κάθε θηλής.

Κάθε θηλή συγκρατήθηκε με μικρού μεγέθους πινέζες σε πίνακα από φελλό και, αφού αποστειρώθηκε η επιφάνειά της με επαφή πυρακτωμένης μεταλλικής σπάτουλας, το δέρμα της διανοίχθηκε με στείρα χειρουργική λεπίδα κατά μήκος. Έτσι, αποκαλύφθηκε ο υποδόριος ιστός. Αυτός διανοίχθηκε με τη σειρά του και αποκαλύφθηκε ο θηλαίος κόλπος. Στη συνέχεια, με νέα λεπίδα, διανοίχθηκε περαιτέρω ο υποδόριος ιστός και αποκαλύφθηκε ο θηλαίος πόρος. Τέλος, με δύο νέες λεπίδες γινόταν ελαφρά απόξεση του βλεννογόνου του θηλαίου πόρου και του θηλαίου κόλπου. Στη συνέχεια, η θηλή ελέγχθηκε σε όλο το μήκος της, ώστε να εντοπιστούν τυχόν αλλοιώσεις.

Εξετάσεις που πραγματοποιήθηκαν

Όλα τα δείγματα που συλλέχθηκαν (συγκεκριμένα: ξέσματα από το θηλαίο πόρο, ξέσματα από το θηλαίο κόλπο), καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία με αιματούχο (5% πρόβειο αίμα) άγαρ Columbia, τα οποία επωάστηκαν σε αερόβιο περιβάλλον σε θερμοκρασία 37 °C έως και 72 ώρες.

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε διάλυμα φορμόλης 10%. Τα ιστοτεμάχια κάθε θηλής που προέκυψαν από επιμήκεις τομές της, εγκλείστηκαν σε παραφίνη και πραγματοποιήθηκαν τομές πάχους 5 μm, για τη χρώση των οποίων χρησιμοποιήθηκε αιματοξυλίνη-εοσίνη (Merck KGaA, Darmstadt, Γερμανία).

Τα ιστολογικά παρασκευάσματα παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο Zeiss Axiostar, χρησιμοποιώντας τους αντικειμενικούς φακούς 5×, 10×, 40× και 100×. Ιδιαίτερα προσδιορίστηκαν οριοθετημένες συσσωρεύσεις λεμφοκυττάρων εντοπισμένες κάτω από το βασικό υμένα του επιθηλίου.

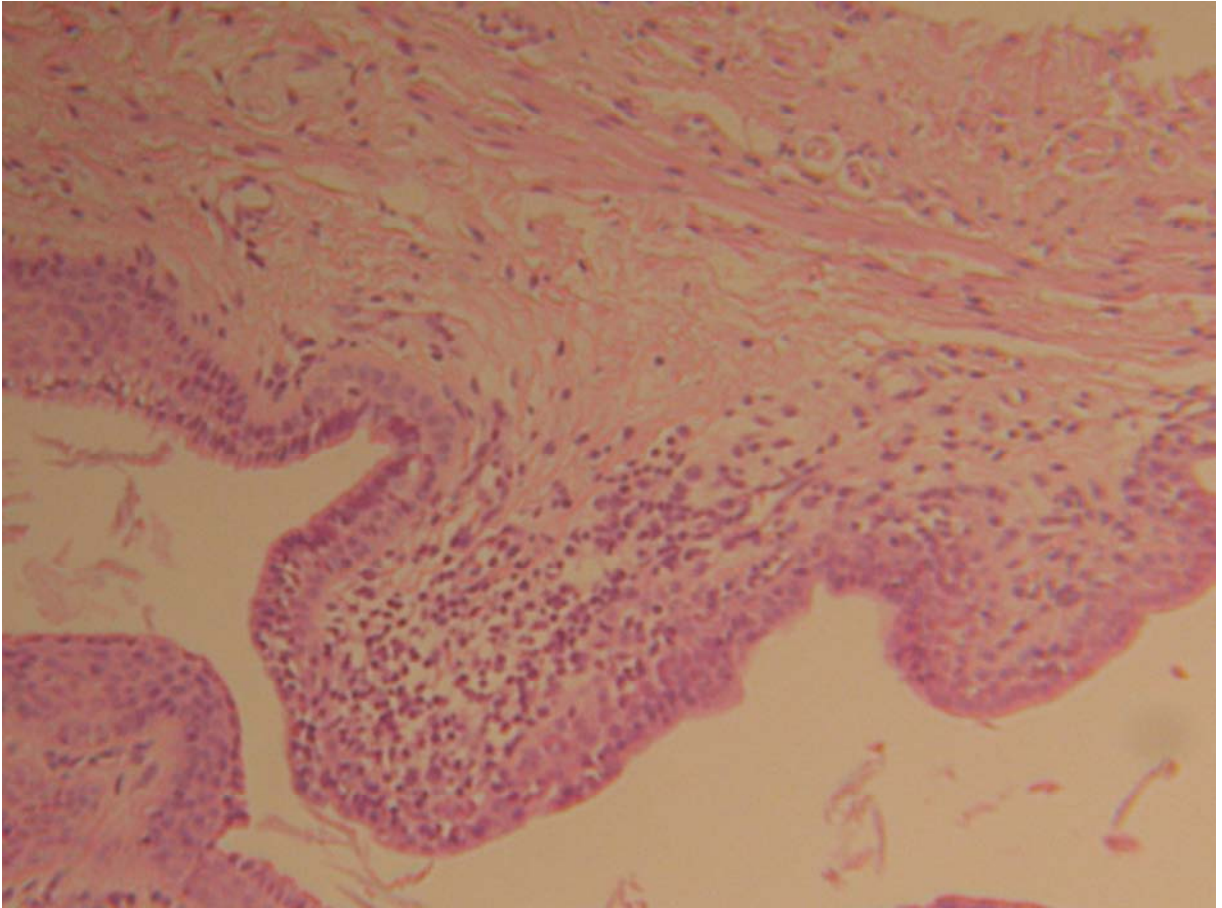
Αποτελέσματα

Από κανένα δείγμα ιστού καμιάς θηλής δεν απομονώθηκαν βακτήρια.

Η ιστολογική εικόνα όλων των τομών παραφίνης που προέρχονταν από τις θηλές του μαστού των αμνάδων, εμφάνιζε την φυσιολογική δομή του επιθηλίου. Το πάχος του επιθηλίου εμφανιζόταν χαρακτηριστικά μικρότερο από αυτό σε ενήλικα ζώα, εξαιτίας της, λόγω ηλικίας, μη πλήρους ωρίμανσης των επιθηλιακών κυττάρων. Το δέρμα φαινόταν απόλυτα φυσιολογικό.

Στο επιθήλιο του θηλαίου κόλπου, κάτω από τη βασική μεμβράνη, καθώς και στα βαθύτερα στρώματά του, παρατηρήθηκε λευκοκυτταρική διήθηση. Σε έξι θηλές (25%) που προέρχονταν από τρεις αμνάδες, παρατηρήθηκαν συναθροίσεις λεμφοκυττάρων στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου. Αυτές οι συναθροίσεις παρατηρήθηκαν και στις δύο θηλές κάθε αμνάδας, είχαν εικόνα χαρακτηριστική θυλακίου, ήταν δε μικρού αριθμού και χωρίς βλαστική δραστηριότητα (Εικόνα V.1). Επιπλέον, στο επιθήλιο του θηλαίου κόλπου παρατηρήθηκε διάχυτη διήθηση από λεμφοκύτταρα (Εικόνες V.2α και V.2β). Δεν παρατηρήθηκαν λευκοκύτταρα στο θηλαίο πόρο.

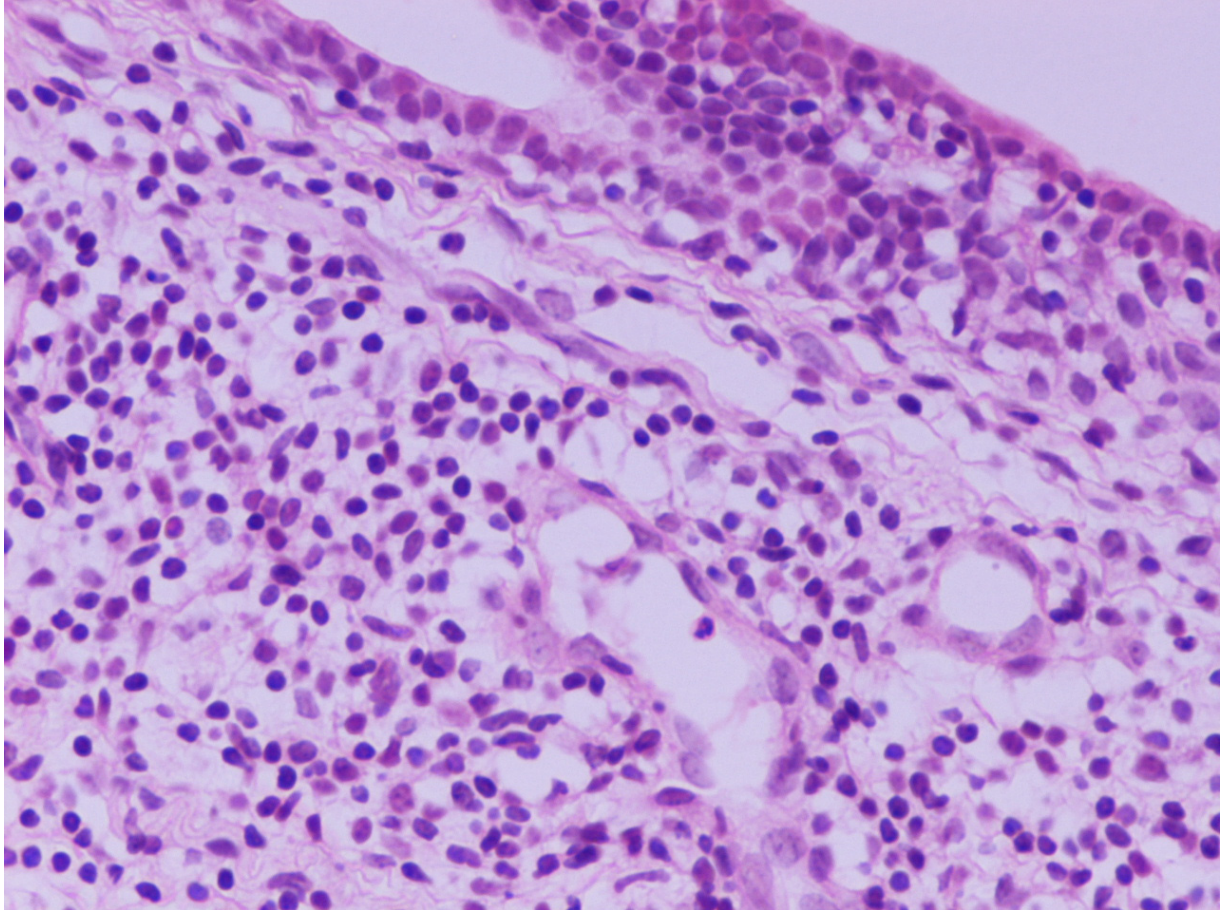
Εικόνα V.1. Συνάθροιση λεμφοκυττάρων με εικόνα χαρακτηριστική θυλακίου στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου αμνάδας που δεν είχε εκδηλώσει αναπαραγωγική δραστηριότητα ($\times 100$).



Εικόνα V.2.

(α)

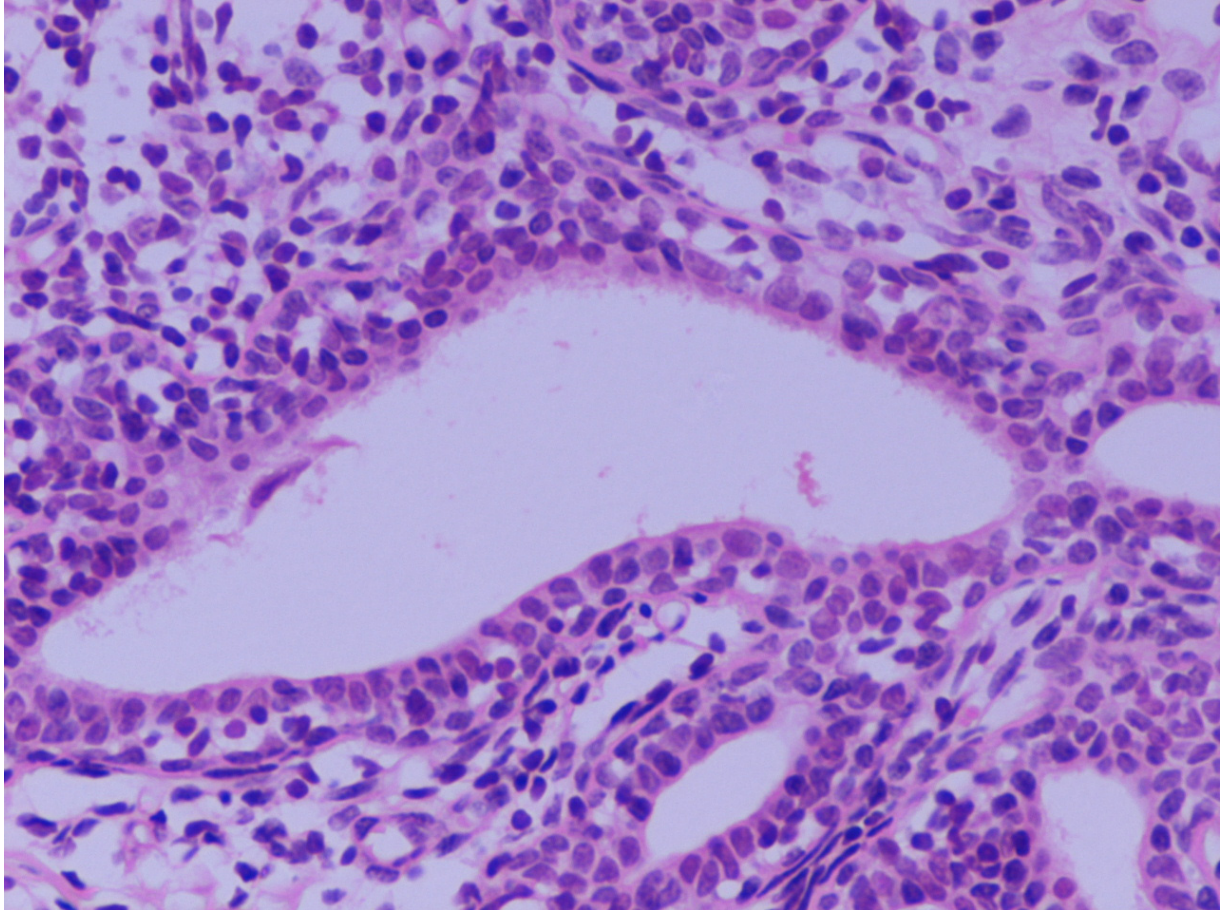
Διήθηση από λεμφοκύτταρα στο επιθήλιο του θηλαίου κόλπου αμνάδας που δεν είχε εκδηλώσει αναπαραγωγική δραστηριότητα ($\times 400$).



Εικόνα V.2.

(β)

Διήθηση από λεμφοκύτταρα στο επιθήλιο του θηλαίου κόλπου αμνάδας που δεν είχε εκδηλώσει αναπαραγωγική δραστηριότητα ($\times 400$).



ΚΕΦΑΛΑΙΟ VI

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΟΣ
***MANNHEIMIA HAEMOLYTICA* ΣΤΗ ΘΗΛΗ**
ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΠΡΟΒΑΤΩΝ
ΔΥΟ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΦΥΛΩΝ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στις αγελάδες, έχουν τεκμηριωθεί διαφορές σχετικά με τη γενετική προδιάθεση στη μαστίτιδα (Detilleux 2002). Όμως, δεδομένου ότι σε όλον τον κόσμο η φυλή Holstein-Friesian αποτελεί την πολυπληθέστερη φυλή γαλακτοπαραγωγών αγελάδων, οι ερευνητές επικεντρώνονται στη μελέτη ατομικών γενετικών διαφορών μεταξύ συγκεκριμένων ζώων, παρά μεταξύ φυλών ζώων. Μάλιστα, έχει αναφερθεί ότι ορισμένα ζώα εντός μίας αγέλης είναι ανθεκτικά σε συγκεκριμένα βακτηριακά στελέχη, τα οποία όμως μπορούν να προκαλέσουν μαστίτιδα σε άλλα ζώα της ίδιας αγέλης (Detilleux 2002).

Σε αντίθεση με τα βοοειδή, υπάρχουν πολλές διαφορετικές φυλές προβάτων που εκτρέφονται σε όλον τον κόσμο, μεταξύ αυτών και πολλές φυλές γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης. Οι διαχρονικές μεταβολές στους στόχους εκτροφής και διαχείρισης των προβάτων έχουν δημιουργήσει την ανάγκη γενετικής βελτίωσης των διαφόρων φυλών. Ωστόσο, οι εγχώριες φυλές (ορισμένες φορές αβελτίωτες) αποτελούν ακόμα σημαντικό ποσοστό του παγκόσμιου πληθυσμού προβάτων (Zygoiannis 2006).

Σε αυτόν τον πειραματισμό παρουσιάζονται και συγκρίνονται τα αποτελέσματα της ευαισθησίας δύο διαφορετικών φυλών προβάτων σε μόλυνση της θηλής του μαστού από *Mannheimia haemolytica*. Αφενός χρησιμοποιήθηκε η Καραγκούνικη φυλή, καθώς αυτή ήδη έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε προηγούμενες μελέτες στη μαστίτιδα (Saratsis, Alexopoulos, Tzora & Fthenakis 1999, Mavrogianni και συν. 2005, Mavrogianni, Cripps και συν. 2006). Αν και τα ζώα αυτά έχουν μέτρια γαλακτοπαραγωγική ικανότητα, γενικά θεωρούνται ανθεκτικά σε διάφορα νοσήματα. Για παράδειγμα, η συχνότητα βακτηριακής πνευμονίας στα ζώα της φυλής αυτής είναι μικρή (Christodoulou & Fthenakis 2005). Αφετέρου, χρησιμοποιήθηκε η φυλή Φρισλανδόμορφη της Άρτας ("Frisarta"), η οποία εμφανίζει μεγάλη γαλακτοπαραγωγική ικανότητα, αλλά και ιδιαίτερη ευπάθεια σε αναπνευστικές λοιμώξεις από *M. haemolytica* (Skoufos και συν. 2006, Zygoiannis 2006).

Με βάση όλα τα παραπάνω, έγινε η υπόθεση ότι πιθανόν να υπήρχαν διαφορές στην παθογόνο δράση του συγκεκριμένου μικροοργανισμού για το μαστικό αδέν των ζώων των δύο φυλών. Αυτό θα βοηθούσε στην κατανόηση της παθογένειας της μαστίτιδας και επιπλέον, θα έπρεπε να λαμβανόταν υπόψη στην περαιτέρω γενετική βελτίωση του ελληνικού πληθυσμού προβάτων.

B. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΔΥΟ ΦΥΛΩΝ

Υλικά και Μέθοδοι

Πειραματικός σχεδιασμός

Πραγματοποιήθηκε ένας πειραματισμός, στον οποίο χρησιμοποιήθηκαν οκτώ πρωτοτόκες προβατίνες Καραγκούνικης φυλής (ομάδα Κ) και άλλες οκτώ πρωτοτόκες προβατίνες φυλής Frisarta (ομάδα Φ), κατά τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου τους. Τα ζώα προέρχονταν από εκτροφή της περιοχής Άρτας και σταβλίστηκαν στις εγκαταστάσεις του ΤΕΙ Ηπείρου. Η διαχείριση των ζώων κατά τη διάρκεια του πειραματισμού ήταν όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο II, Τμήμα Β).

Τα αρνιά τους απογαλακτίστηκαν τη 18η ημέρα μετά τον τοκετό. Στη συνέχεια, τα πειραματόζωα αρμέγονταν, πάντοτε από το ίδιο άτομο, τρεις φορές καθημερινά. Μία θηλή του μαστού κάθε ζώου της ομάδας Κ ενοφθαλμίστηκε με 1.250 cfu (διακύμανση: 1.220-1.300 cfu) και της ομάδας Φ με 1.230 cfu (διακύμανση: 1.200-1.280 cfu), *M. haemolytica*, στέλεχος VSM08L, δύο ημέρες αργότερα (20ή ημέρα της γαλακτικής περιόδου).

Η προετοιμασία των ζώων για τον ενοφθαλμισμό, η προετοιμασία των στελεχών *M. haemolytica* και η διαδικασία ενοφθαλμισμού έχουν περιγραφεί προηγουμένως (Κεφάλαιο III, Τμήμα Β).

Εξετάσεις πριν και μετά τον ενοφθαλμισμό

Πραγματοποιούνταν κλινική εξέταση των ζώων και λαμβάνονταν δείγματα υλικού θηλαίου πόρου και γάλακτος για βακτηριολογική και κυτταρολογική εξέταση, όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο III, Τμήμα Β). Επίσης, έγινε παθολογοανατομική εξέταση (μακροσκοπική νεκροτομική και ιστοπαθολογική εξέταση) μετά από ευθανασία των ζώων, όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο III, Τμήμα Β). Ευθανασία έγινε ως εξής: σε τέσσερα ζώα κάθε ομάδας μία ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό (D1) και στα υπόλοιπα τέσσερα ζώα κάθε ομάδας τρεις ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό (D3) (εκτός από ένα ζώο της ομάδας Φ, το οποίο πέθανε την ημέρα D2).

Υπολογισμοί και στατιστική ανάλυση

Οι διαφορές μεταξύ του ενοφθαλμισμένου και του μη ενοφθαλμισμένου ημιμορίου του ίδιου ζώου συγκρίθηκαν με τη δοκιμή McNemar. Όταν από όλα τα δείγματα κάποιου ζώου απομονώθηκαν βακτήρια, τότε ορίστηκε ότι "όλα τα δείγματα ήταν θετικά". Στην αντίθετη περίπτωση, ορίστηκε ότι "δεν ήταν όλα τα δείγματα θετικά". Με βάση τον παραπάνω ορισμό και χρησιμοποιώντας τη δοκιμή "Fisher-Exact" συγκρίθηκαν οι διαφορές μεταξύ των δύο φυλών στην εκδήλωση κλινικής μαστίτιδας μετά τον ενοφθαλμισμό, καθώς και στα αποτελέσματα της βακτηριολογικής εξέτασης.

Για την εκτίμηση των παθολογοανατομικών ευρημάτων χρησιμοποιήθηκε το σύστημα βαθμολόγησης που περιγράφηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο III, Τμήμα Β). Για τη σύγκριση των διαφορών της τιμής της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων μεταξύ των δύο ομάδων, την ημέρα D1 και την ημέρα D3, χρησιμοποιήθηκε η δοκιμή Kruskal-Wallis. Πραγματοποιήθηκαν διαφορετικές αναλύσεις για τη θηλή και το μαστικό παρέγχυμα.

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα Minitab 15 (Minitab Inc., State College, PA, ΗΠΑ) και Stata-9 (Stata Corporation LP, College Station, TX, ΗΠΑ).

Κατά τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η τιμή $P < 0,05$ για τον ορισμό της στατιστικής σημαντικότητας.

Αποτελέσματα

Ευρήματα πριν τον ενοφθαλμισμό

Όλες οι προβατίνες ήταν κλινικά υγιείς πριν τον ενοφθαλμισμό τους. Οι θηλές του μαστού ήταν μαλακές, χωρίς αλλοιώσεις. Δεν απομονώθηκαν βακτήρια από το υλικό του θηλαίου πόρου και από το γάλα. Η αντίδραση της δοκιμής CMT ήταν αρνητική ($< "1"$) σε όλα τα δείγματα. Στα επιχρίσματα γάλακτος παρατηρήθηκαν περιστασιακά λίγα μακροφάγα.

Κλινικά, βακτηριολογικά και κυτταρολογικά ευρήματα μετά τον ενοφθαλμισμό

Ενοφθαλμισμένα ημιμόρια

Ομάδα Κ

Οι προβατίνες της ομάδας Κ δεν εκδήλωσαν κλινικά συμπτώματα.

M. haemolytica απομονώθηκε από 34 από τα 48 δείγματα υλικού θηλαίου πόρου και γάλακτος.

Θετική αντίδραση ($\geq 1''$) στη δοκιμή CMT παρατηρήθηκε σε 17 από τα 24 δείγματα γάλακτος. Στα επιχρίσματα γάλακτος παρατηρήθηκαν λευκοκύτταρα. Τα περισσότερα (>80%) ήταν ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα, ενώ, σε μικρότερο ποσοστό, παρατηρήθηκαν μακροφάγα και λεμφοκύτταρα (5-15% και 0-10%, αντίστοιχα).

Ομάδα Φ

Όλες οι προβατίνες της ομάδας Φ εκδήλωσαν γενικά κλινικά συμπτώματα (πυρετός έως 41,5 °C, ανορεξία, κατάπτωση). Σε τρία ζώα παρατηρήθηκε επίσης ήπια διάρροια. Όλες οι προβατίνες εκδήλωσαν κλινική μαστίτιδα εντός 24 ωρών από τον ενοφθαλμισμό. Παρατηρήθηκαν αυξημένη θερμοκρασία και αυξημένο μέγεθος του μαστικού αδένος, ερυθρότητα του δέρματος του μαστού, πόνος κατά την ψηλάφηση και δυσκολία στην άρμεξη. Το μαστικό έκκριμα ήταν ορώδες ή πυώδες και περιείχε πύργα ή νιφάδες. Μία προβατίνα πέθανε την ημέρα D2.

M. haemolytica απομονώθηκε από όλα τα δείγματα υλικού θηλαίου πόρου και γάλακτος (46 από τα 46).

Θετική αντίδραση ($\geq 1''$) στη δοκιμή CMT παρατηρήθηκε σε όλα τα δείγματα γάλακτος (23 από τα 23). Στα επιχρίσματα γάλακτος παρατηρήθηκαν λευκοκύτταρα. Τα περισσότερα (>85%) ήταν ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα, ενώ, σε μικρότερο ποσοστό, παρατηρήθηκαν μακροφάγα και λεμφοκύτταρα (5-10% και 0-10%, αντίστοιχα).

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα VI.i.

Μη ενοφθαλμισμένα ημιμόρια

Στα μη ενοφθαλμισμένα ημιμόρια των ζώων των ομάδων Κ και Φ, δεν παρατηρήθηκαν παθολογικά κλινικά ευρήματα. Από τα δείγματα υλικού θηλαίου πόρου και γάλακτος, δεν απομονώθηκαν βακτήρια. Σε όλα τα δείγματα γάλακτος, παρατηρήθηκε αρνητική αντίδραση ($< 1''$) στη δοκιμή CMT. Στα επιχρίσματα γάλακτος παρατηρήθηκαν περιστασιακά λίγα μακροφάγα.

Συγκρίσεις

Μεταξύ των ζώων της ίδιας ομάδας (φυλής), η πιθανότητα εκδήλωσης μαστίτιδας μετά την εναπόθεση του βακτηρίου στη θηλή ήταν σημαντικά μεγαλύτερη σε σχέση με την ετερόπλευρη θηλή ($P<0,001$).

Υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στην εκδήλωση κλινικής μαστίτιδας μεταξύ των δύο ομάδων (φυλών). Στην ομάδα Κ, κανένα από τα οκτώ ζώα δεν εκδήλωσε κλινική μαστίτιδα, ενώ στην ομάδα Φ νόσησαν και τα οκτώ ζώα ($P<0,001$).

Στην ομάδα Κ υπήρχε σημαντικά μικρότερη αναλογία ζώων όπου "όλα τα δείγματα ήταν θετικά" σε σχέση με τα ζώα της ομάδας Φ μέχρι τις δύο πρώτες δειγματοληψίες: η στατιστική σημαντικότητα την ημέρα D0 (12 h) ήταν $P<0,001$ και την ημέρα D1 ήταν $P=0,026$. Στη συνέχεια, δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά την ημέρα D2 ($P=0,214$) και την ημέρα D3 ($P=0,571$).

Πίνακας VI.i. Βακτηριολογικά ευρήματα και αποτελέσματα δοκιμής CMT σε προβατίνες φυλής Καραγκούνικης (Κ) ή Frisarta (Φ) μετά τον ενοφθαλμισμό *M. haemolytica* εντός του θηλαίου πόρου τους.

	Χρονικό σημείο του πειραματισμού / Ομάδες									
	D0 ^α (12 h)		D1 ^α		D2 ^α		D3 ^α		Σύνολο	
	Κ	Φ	Κ	Φ	Κ	Φ	Κ	Φ	Κ	Φ
Απομόνωση <i>M. haemolytica</i>										
ΘΠ ^β	8/8	8/8	8/8	8/8	4/4	4/4	4/4	3/3	24/24	23/23
ΜΕ ^β	2/8	8/8	3/8	8/8	2/4	4/4	3/4	3/3	10/24*	23/23*
Σύνολο	10/16*	16/16*	11/16*	16/16*	6/8	8/8	7/8	6/6	34/48*	46/46*
Αποτελέσματα δοκιμής CMT										
Θετική										
αντίδραση (≥"1")	4/8	8/8	6/8	8/8	3/4	4/4	4/4	3/3	17/24	23/23

α. D1, D2, κ.λπ. = ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό.

β. ΘΠ = θηλαίος πόρος, ΜΕ = μαστικό έκκριμα.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως n/m=θετικά αποτελέσματα στο σύνολο των δειγμάτων που ελήφθησαν.

*: $P<0,05$.

Παθολογοανατομικά ευρήματα

Βακτηριολογικά ευρήματα στα δείγματα ιστών

Ενοφθαλμισμένα ημιμόρια

Ομάδα Κ

M. haemolytica απομονώθηκε από 12 από τα 24 δείγματα θηλής και μαστικού παρεγχύματος.

Ομάδα Φ

M. haemolytica απομονώθηκε από όλα τα δείγματα θηλής και μαστικού παρεγχύματος (24 από τα 24).

Συγκρίσεις

Τα ζώα της ομάδας Κ είχαν σημαντικά μικρότερη αναλογία βακτηριολογικά θετικών αποτελεσμάτων σε σχέση με τα αντίστοιχα αποτελέσματα της ομάδας Φ την ημέρα D1 ($P=0,029$), όχι όμως την ημέρα D3 ($P=0,071$).

Μη ενοφθαλμισμένα ημιμόρια

Ομάδα Κ

Δεν απομονώθηκαν βακτήρια από κανένα δείγμα θηλής ή μαστικού παρεγχύματος.

Ομάδα Φ

M. haemolytica απομονώθηκε από το δείγμα μαστικού παρεγχύματος της προβατίνας, που πέθανε την ημέρα D2. Δεν απομονώθηκαν βακτήρια από κανένα δείγμα θηλής ή μαστικού παρεγχύματος άλλης προβατίνας.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα VI.ii.

Μακροσκοπικά νεκροτομικά και ιστοπαθολογικά ευρήματα

Ενοφθαλμισμένα ημιμόρια

Από τη σύγκριση του μήκους του αυλού της θηλής με το μήκος του χρησιμοποιούμενου για τον ενοφθαλμισμό καθετήρα, επιβεβαιώθηκε ότι το ενοφθάλμισμα είχε τοποθετηθεί στο θηλαίο πόρο.

Ομάδα Κ

Σε γενικές γραμμές, τα μακροσκοπικά νεκροτομικά και τα ιστοπαθολογικά ευρήματα ήταν παρόμοια με αυτά που περιγράφηκαν προηγουμένως (Κεφάλαιο III, Τμήμα Β), μετά από ενοφθαλμισμό *M. haemolytica*, στέλεχος VSM08L.

Το άθροισμα των τιμών της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων ήταν 41 (μέγιστη δυνατή συνολική τιμή: 128).

Ομάδα Φ

Στις θηλές, μακροσκοπικά παρατηρήθηκε έντονη πτύχωση, υπεραιμία και πάχυνση του βλεννογόνου, αν και υπήρχε σαφής διαχωρισμός του θηλαίου πόρου από το θηλαίο κόλπο. Ειδικά στην προβατίνα που πέθανε, η ανατομική δομή της θηλής είχε χαθεί. Ιστολογικά, παρατηρήθηκε έντονη διήθηση από ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα κάτω από το βασικό υμένα του επιθηλίου, καθώς και στα βαθύτερα στρώματά του. Επίσης, παρατηρήθηκαν παρουσία λεμφοκυττάρων και πλασμοκυττάρων και καταστροφή των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων. Στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου, δεν παρατηρήθηκαν οι χαρακτηριστικές συναθροίσεις λεμφοκυττάρων.

Στο σύστοιχο μαστικό παρέγχυμα παρατηρήθηκαν έντονη διόγκωση και συμφόρηση του αδένος, υποδόριο οίδημα και εκροή οροαιμορραγικού εξιδρώματος κατά τη διατομή. Επίσης, παρατηρήθηκε συμφόρηση και διάταση των αγγείων. Τα επιχώρια λεμφογάγγλια ήταν έντονα διογκωμένα και οίδηματικά. Στην προβατίνα που πέθανε, ο μαστικός αδένος παρουσίασε εκτενή διόγκωση και συμφόρηση, καθώς και αξιοσημείωτο υποδόριο οίδημα και αποχρωματισμό του υποκείμενου δέρματος. Τα ιστοπαθολογικά ευρήματα περιλάμβαναν έντονη διήθηση από ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα, ενδοκυψελιδική παρουσία ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων (καταστραμμένων ή μη), ρήξη αγγείων, αιμορραγίες και αποδιοργάνωση της αρχιτεκτονικής δομής των επιθηλιακών κυττάρων των αδενοκυψελών.

Το άθροισμα των τιμών της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων ήταν 93 (μέγιστη δυνατή συνολική τιμή: 128).

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα VI.ii.

Συγκρίσεις

Η τιμή της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων στη θηλή ήταν σημαντικά μεγαλύτερη για τα ζώα της ομάδας Κ την ημέρα D1 ($P=0,04$), όχι όμως την ημέρα D3 ($P=0,278$). Η τιμή της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων στο μαστικό παρέγχυμα ήταν πάντοτε μεγαλύτερη για τα ζώα της ομάδας Φ ($P<0,02$).

Μη ενοφθαλμισμένα ημιμόρια

Στο μαστικό παρέγχυμα της προβατίνας που πέθανε (ομάδα Φ) παρατηρήθηκε ήπια διήθηση από ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα.

Κανένα μακροσκοπικό ή ιστολογικό παθολογικό εύρημα δεν παρατηρήθηκε στο μη ενοφθαλμισμένο ημιμόριο οποιασδήποτε άλλης προβατίνας (ομάδας Κ ή ομάδας Φ).

Το άθροισμα των τιμών της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων ήταν 0 και 2 (μέγιστη δυνατή συνολική τιμή: 128) για την ομάδα Κ και Φ, αντίστοιχα.

Πίνακας VI.ii. Βακτηριολογικά ευρήματα (απομόνωση *M. haemolytica*) και τιμές της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων σε δείγματα ιστών μετά τον ενοφθαλμισμό *M. haemolytica* στο θηλαίο πόρο προβατίνων φυλής Καραγκούνικης (Κ) ή Frisarta (Φ).

	Χρονικό σημείο του πειραματισμού / Ομάδες			
	D1 ^α		D3 ^α	
	Κ	Φ	Κ	Φ
Απομόνωση <i>M. haemolytica</i> από δείγματα ιστών				
Θηλαίος πόρος	3/4	4/4	4/4	4/4
Θηλαίος κόλπος	2/4	4/4	3/4	4/4
Παρέγχυμα	0/4	4/4	1/4	4/4
Σύνολο	4/12*	12/12*	8/12	12/12 ^β
Τιμές της βαρύτητας των παθολογοανατομικών ευρημάτων				
Θηλή	17*	13*	17	21 ^γ
Παρέγχυμα	2*	29*	5*	30* ^γ
Συνολικά	19*	42*	22*	51*

α. D1 και D3 = ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό.

β. Περιλαμβάνονται και 3/3 δείγματα της προβατίνας που πέθανε την ημέρα D2.

γ. Περιλαμβάνονται και οι τιμές αξιολόγησης των παθολογοανατομικών ευρημάτων στη θηλή (7) και στο παρέγχυμα (8) της προβατίνας που πέθανε την ημέρα D2.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως n/m=θετικά αποτελέσματα στο σύνολο των δειγμάτων που ελήφθησαν.

*: $P < 0,05$.

ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Εισαγωγή

Η μαστίτιδα αποτελεί την πιο σημαντική παθολογική κατάσταση του μαστού και ένα από τα σημαντικότερα νοσήματα στις προβατοτροφικές εκμεταλλεύσεις γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης (Menzies & Ramanoon 2001, Bergonier & Berthelot 2003, Bergonier και συν. 2003). Στις περισσότερες περιπτώσεις, η ασθένεια προκαλείται από σταφυλοκόκκους ή από *Mannheimia haemolytica* (Bergonier & Berthelot 2003, Bergonier και συν. 2003). Οι αμυντικοί μηχανισμοί των ζώων σε περίπτωση μαστίτιδας δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς.

Η παρούσα μελέτη εστιάζεται στους αμυντικούς μηχανισμούς της θηλής του μαστού. Η θηλή είναι η πύλη εισόδου των μικροβίων και αποτελεί το σημείο όπου γίνονται οι πρώτες αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών και των αμυντικών μηχανισμών του ζώου. Η διαλεύκανση των αμυντικών μηχανισμών και η επακόλουθη ενίσχυσή τους, θα διευρύνει τις δυνατότητες πρόληψης της ασθένειας.

Τα ευρήματα αυτής της έρευνας καταδεικνύουν τη σημασία της θηλής στην παθογένεια της μαστίτιδας των προβατίνων. Στην έρευνα, χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές που είχαν αξιολογηθεί σε προηγούμενες μελέτες, όπως για παράδειγμα η χρήση λεπτού καθετήρα για λήψη υλικού θηλαίου πόρου ή η πρόκληση δερματικών αλλοιώσεων ως πρότυπο αποδυνάμωσης των αμυντικών μηχανισμών της θηλής.

Διείσδυση του βακτηρίου *Mannheimia haemolytica* στη θηλή του μαστού των προβάτων

Οι παθογόνοι για το μαστικό αδέν των προβατίνων μικροοργανισμοί, προέρχονται από διάφορες πηγές: (α) από το περιβάλλον των ζώων, (β) από το μαστικό αδέν μολυσμένων ζώων, (γ) από τα χέρια των αρμεκτών ή/και (δ) από τα αρνιά που θηλάζουν τη μητέρα τους. Στο κεφάλαιο II, περιγράφηκαν δύο πειραματισμοί, σκοπός των οποίων ήταν η μελέτη της διείσδυσης του βακτηρίου *M. haemolytica* στη θηλή και επακόλουθα στο μαστικό παρέγχυμα.

Στον πρώτο πειραματισμό, χρησιμοποιήθηκαν ένα στέλεχος από το θηλαίο πόρο προβατίνας ("μαστικό στέλεχος") και ένα στέλεχος από την ανώτερη αναπνευστική οδό αρνιών ("αναπνευστικό στέλεχος") και μελετήθηκε η διείσδυσή τους στη θηλή. Ο ενοφθαλμισμός του στελέχους έγινε στο κατώτερο άκρο του δέρματος της θηλής, ώστε να προσομοιωθούν οι συνέπειες του θηλασμού από τα αρνιά, δεδομένου ότι σε προηγούμενες μελέτες (Γκουγκουλής

2007, Gougoulis και συν. 2008) αποδείχθηκε η δυνατότητα μεταφοράς βακτηρίων από την ανώτερη αναπνευστική οδό των αρνιών στο δέρμα της θηλής και στο θηλαίο πόρο των προβατίνων κατά τη διάρκεια του θηλασμού.

Σχετικά με τον αποικισμό του δέρματος της θηλής από βακτήρια και την επακόλουθη διείσδυση των βακτηρίων στο θηλαίο πόρο και στο μαστικό αδέν, βρέθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ υγιών θηλών και θηλών με αλλοιώσεις. Ανάλογες διαφορές δε βρέθηκαν μεταξύ των δύο στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν για τους ενοφθαλμισμούς. Σημειώνεται ότι ακόμη και η σύντομη (5 έως 7 sec) επαφή *M. haemolytica* με το κάτω άκρο της θηλής μπορεί να οδηγήσει σε διείσδυσή της στο θηλαίο πόρο (Γκουγκουλής 2007, Gougoulis και συν. 2008). Σε ανάλογη μελέτη σε αγελάδες, η εναπόθεση *Escherichia coli* γύρω από το στόμιο της θηλής αμέσως μετά την άρμεξη (δηλαδή, όταν η θηλή ήταν καταπονημένη) προκάλεσε αύξηση της πιθανότητας ενδομαστικής μόλυνσης (Bramley, Godinho & Grindal 1981).

Στο δεύτερο πειραματισμό, τα ζώα χωρίστηκαν σε δύο ομάδες (με θηλές υγιείς ή με θηλές που είχαν αλλοιώσεις), αλλά δεν έγινε ενοφθαλμισμός των θηλών του μαστού. Σε αυτήν την περίπτωση, τα αρνιά παρέμειναν και θήλαζαν τις μητέρες τους. Διαπιστώθηκαν πάλι σημαντικές διαφορές μεταξύ υγιών θηλών και θηλών με αλλοιώσεις σε ό,τι αφορούσε στη διείσδυση των βακτηρίων στο θηλαίο πόρο και στο μαστικό αδέν.

Οι αλλοιώσεις στο δέρμα της θηλής συνέβαλαν στη σημαντική αύξηση της μόλυνσης του θηλαίου πόρου. Σε περιπτώσεις κακών καιρικών συνθηκών, με έντονο κρύο, έχει παρατηρηθεί μεγάλη συχνότητα εμφάνισης επιφανειακών αλλοιώσεων στις θηλές, γεγονός το οποίο συσχετίστηκε περαιτέρω με αυξημένη συχνότητα μολύνσεων του μαστικού αδέν (Fox & Hancock 1989). Στις προβατίνες, ο Leyshon (1929) και ο Clark (1972) ανέφεραν παλαιότερα ότι η μαστίτιδα εκδηλωνόταν πιο συχνά σε περιόδους ψύχους, γεγονός το οποίο μπορεί να συσχετίζεται με αλλοιώσεις στις θηλές τους.

Σε τέτοιες περιπτώσεις, λαμβάνουν χώρα διάφορες φυσικοχημικές μεταβολές στο δέρμα. Ειδικότερα, μειώνεται η συγκέντρωση αντιβακτηριακών λιπαρών οξέων, βακτηριοστατικών πρωτεϊνών και ανοσοσφαιρινών (Noble & Somerville 1974). Παράλληλα, λαμβάνει χώρα μεταβολή της βακτηριακής χλωρίδας του δέρματος, με αποτέλεσμα τη μείωση της αντίστασής του στον αποικισμό από παθογόνα βακτήρια (Fox & Cumming 1995). Επίσης, καταστρέφεται ο όξινος προστατευτικός μανδύας του δέρματος (Raab 1990). Επιπλέον, λόγω των εκδορών και των σχισμών, αυξάνεται η συνολική επιφάνεια του δέρματος της θηλής του μαστού, υποβοηθώντας έτσι την εύκολη και αυξημένη προσκόλληση των βακτηρίων και τη δημιουργία συσσωματωμάτων ή βιομεμβρανών (Sieber & Farnsworth 1984, Fox και συν. 1991).

Όταν λοιπόν το δέρμα της θηλής είναι σε κακή κατάσταση, διευκολύνεται ο αποικισμός του και, συνεπώς, εντείνεται η παρουσία μεγάλου αριθμού βακτηρίων κοντά στο στόμιο της θηλής και το θηλαίο πόρο. Έτσι, μπορεί κάποιος να υποθέσει ότι σε καιρικές συνθήκες με χαμηλή θερμοκρασία, οπότε τα νεογέννητα προσεγγίζουν πιο συχνά στις θηλές της μητέρας τους (Slee & Springbett 1986, Reif, Field & Diego 2001) και υπάρχει προδιάθεση ανάπτυξης αλλοιώσεων στο δέρμα της θηλής (Fox & Hancock 1989, Burmeister, Fox, Hancock, Gay, Gay, Parish & Tyler 1995), ο θηλασμός συμβάλλει στη μεταφορά *M. haemolytica* στη θηλή. Τότε, τα μικρόβια αυτά μπορούν να εισέλθουν πιο εύκολα στο θηλαίο πόρο και στη συνέχεια να προκαλέσουν μαστίτιδα, όπως επιβεβαιώθηκε από τα αποτελέσματα των πειραματισμών. Έτσι, μπορεί να ερμηνευτούν και τα ευρήματα του Leyshon (1929) και του Clark (1972), σχετικά με την αύξηση της συχνότητας εμφάνισης μαστίτιδας σε κακές καιρικές συνθήκες.

Συνέπειες του ενοφθαλμισμού ενός στελέχους *M. haemolytica* από μαστό προβάτου, στη θηλή του μαστού των προβάτων

Σε φυσικές συνθήκες, το βακτήριο *M. haemolytica* εισέρχεται στη θηλή κατά τη διάρκεια του θηλασμού (Gougoulis και συν. 2008). Αντικείμενο του πρώτου πειραματισμού που περιγράφεται στο κεφάλαιο III, ήταν η περιγραφή των γεγονότων αμέσως μετά τη είσοδο *M. haemolytica* στη θηλή.

Η αύξηση των λευκοκυττάρων στο γάλα έδειξε ότι ο ενοφθαλμισμός *M. haemolytica* στο θηλαίο πόρο προκάλεσε φλεγμονώδη αντίδραση στο μαστικό αδένα, ήδη εντός 2 ωρών μετά τη μόλυνση. Οι Persson-Waller, Colditz και Seow (1997) ανέφεραν ότι ο ενοφθαλμισμός *E. coli* στη θηλή του μαστού προβατίνων προκάλεσε λευκοκυτταρική αντίδραση εντός 8 ωρών μετά τη μόλυνση. Τα ευρήματα αποδεικνύουν τον προστατευτικό ρόλο της θηλής μέσω της κινητοποίησης των αμυντικών φαγοκυττάρων προς το σημείο της μόλυνσης.

Η αρχική αύξηση του αριθμού των λευκοκυττάρων στο γάλα συμβάδιζε με την παροδική μείωση του αριθμού των λευκοκυττάρων στο αίμα. Στη συνέχεια, παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού των λευκοκυττάρων στο αίμα που ξεπέρασε τα 9.000 λευκοκύτταρα μL^{-1} . Κατά τη διάρκεια της υποξείας φάσης της μόλυνσης, ο αριθμός των λευκοκυττάρων στο αίμα μειώθηκε στην προ της μόλυνσης τιμή. Όμως, το ποσοστό άωρων ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων επί του συνολικού αριθμού των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων παρέμενε μεγαλύτερο από 3% (Bush 1993). Το γεγονός αυτό καταδεικνύει την ύπαρξη ενεργού φλεγμονώδους αντίδρασης στα ζώα

και την απαίτηση για αυξημένο αριθμό ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων στους ιστούς (Bush 1993).

Φαίνεται από τα παρόντα ευρήματα ότι τα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα δεν ήταν ικανά να περιορίσουν τη μόλυνση στη θηλή, καθώς, στη συνέχεια, ο μικροοργανισμός απομονώθηκε από το γάλα, δηλαδή διείσδυσε στο μαστικό αδέν. Η παραγωγή λευκοτοξίνης με κυτταροτοξική δράση (Zecchinon, Fett & Desmech 2005) από τη *M. haemolytica*, συνέβαλε στην επιβίωση του μικροοργανισμού και στην εισβολή του στο μαστικό αδέν. Τα λεμφοκύτταρα, τα οποία μετανάστευσαν στο σημείο της φλεγμονής σε μεταγενέστερο χρονικό σημείο (την ημέρα D3), συγκροτούν έναν επόμενο μηχανισμό άμυνας του ζώου.

Η αύξηση της ηχογένειας στη θηλή συνάδει με την αρχική είσοδο λευκοκυττάρων στο θηλαίο κόλπο 8 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό του μικροβίου. Τα ευρήματα αυτά παρατηρήθηκαν έως την ημέρα D2, καταδεικνύοντας τον αυξημένο αριθμό λευκοκυττάρων στη θηλή σε αυτό το στάδιο της λοίμωξης. Στη συνέχεια, η ηχογένεια της θηλής επανήλθε στο φυσιολογικό, προφανώς συμβαδίζοντας με τη μείωση του αριθμού των λευκοκυττάρων σε αυτήν. Χρονικά, αυτό συνέπεσε με την υποχώρηση των κλινικών συμπτωμάτων, τα οποία είναι η έκφραση της όλης φλεγμονώδους αντίδρασης (Paape και συν. 1985, Zecchinon και συν. 2005).

Είναι γνωστόν ότι η μείωση της περιεκτικότητας της λακτόζης στο μαστικό έκκριμα είναι αποτέλεσμα της μειωμένης σύνθεσής της στους καταστραμμένους ιστούς (Pyorala 2003). Είναι επίσης δεδομένο, ότι η λακτόζη καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την ωσμωτική πίεση του γάλακτος (Pyorala 2003). Συνεπώς, η μείωση της συγκέντρωσής της -εύρημα της παρούσας μελέτης- οδηγεί σε επακόλουθες μεταβολές στη συγκέντρωση των ιόντων, ώστε η ωσμωτική πίεση να διατηρείται σταθερή (Pyorala 2003). Συνακόλουθα, παρατηρείται είσοδος ιόντων χλωρίου και καλίου προς το εσωτερικό των μαστικών κυττάρων και έξοδος ιόντων νατρίου από αυτό. Η αύξηση του pH του γάλακτος ήδη 8 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη, συνάδει απόλυτα με τα παραπάνω βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με τις μεταβολές ιόντων, σε περίπτωση μείωσης της συγκέντρωσης λακτόζης στο μαστικό αδέν. Ταυτόχρονα, λόγω της φλεγμονής του μαστικού αδέν, προκαλείται διαπίδυση των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων από το αίμα στο μαστικό ιστό, γεγονός που εξηγεί την παρουσία άωρων ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων στο αίμα, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Όμως, σε αυξημένο pH (>6,8) αυξάνεται ο πολλαπλασιασμός της *M. haemolytica* και βελτιώνεται η παραγωγή λευκοτοξίνης από αυτήν (Van Rensburg, Du Preez & Ellis 2006), γεγονότα που επιδεινώνουν τη φλεγμονή του μαστικού αδέν. Μάλιστα, η επάνοδος του pH σε φυσιολογικές τιμές την ημέρα D3, συμβάδιζε με τη μείωση της συχνότητας απομόνωσης του μικροοργανισμού από το γάλα.

Σε ό,τι αφορά στην επίδραση της μαστίτιδας των προβατίνων στην περιεκτικότητα λίπους και πρωτεϊνών στο γάλα, τα διαθέσιμα βιβλιογραφικά δεδομένα είναι αντικρουόμενα. Η Burriel (1997α) και οι Leitner, Chaffer, Caraso, Ezra, Kababea, Winkler, Glickman και Saran (2003) ανέφεραν αύξηση της συγκέντρωσης του λίπους και των πρωτεϊνών σε έκκριμα από φλεγμαίνοντες μαστικούς αδένες, ενώ αντίθετα οι Leitner, Chaffer, Shamay, Shapiro, Merin, Ezra, Saran και Silanikove (2004) και οι Santos, Mendonca, Alfonso και Simao (2007) ανέφεραν αντίστοιχη μείωση. Όμως, όλες οι παραπάνω μελέτες έγιναν σε συνθήκες εκτροφής, όπου συνυπήρχε πληθώρα παραγόντων, οι οποίοι πιθανόν επηρέασαν τα ευρήματα. Αντίθετα, δεν υπάρχουν πειραματικά δεδομένα για την επίδραση της μαστίτιδας στη σύνθεση του γάλακτος. Τα παρόντα ευρήματα υποδεικνύουν σαφώς τη μείωση της περιεκτικότητας του γάλακτος σε λίπος και ολικές πρωτεΐνες, προφανώς ως συνέπεια της καταστροφής των μαστικών επιθηλιακών κυττάρων που λαμβάνει χώρα μετά τον ενοφθαλμισμό.

Η παρουσία συναθροίσεων λεμφοκυττάρων στη θηλή του μαστού των προβάτων περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Manrogianni και συν. (2005). Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν ειδικά αντισώματα για ανίχνευση Β-λεμφοκυττάρων (αντιγόνο CD79), Τ-λεμφοκυττάρων (αντιγόνο CD3 ή αντιγόνο γδ), Τ-βοηθητικών λεμφοκυττάρων (αντιγόνο CD4), Τ-κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων (αντιγόνο CD8), μακροφάγων (αντιγόνο CD68) και παραγόντων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας 2ης τάξης (αντιγόνο MHC-II), αποσκοπώντας στη διερεύνηση των κυτταρικών υποπληθυσμών στην οξεία και την υποξεία φάση της μαστίτιδας στις προβατίνες. Έτσι, εξετάστηκαν δείγματα από θηλές, για να ταυτοποιηθούν οι υποπληθυσμοί των λεμφοκυττάρων που ενεργοποιούνταν σε αυτές. Καθώς με την ιστοπαθολογική εξέταση είχαν παρατηρηθεί λεμφοκύτταρα μόνο σε θηλές ζώων την ημέρα D3 ή την ημέρα D5 του πειραματισμού, εξετάστηκαν ανοσοϊστοχημικά αυτά τα δείγματα. Εξετάστηκαν επίσης, δείγματα από τα επιχώρια λεμφογάγγλια όλων των ζώων, ώστε να καθοριστούν οι κυτταρικοί πληθυσμοί που δρουν τοπικά.

Βρέθηκε ότι οι πληθυσμοί λεμφοκυττάρων που ενεργοποιούνταν στη θηλή, ήταν κυρίως τα Β-λεμφοκύτταρα και τα Τ-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα. Η ταυτόχρονη παρουσία τους στη θηλή ενισχύει την υπόθεση σχετικά με την ανάπτυξη τοπικής, οργανωμένης λεμφοκυτταρικής αντίδρασης έναντι των εισβαλλόντων βακτηρίων. Η περιορισμένη παρουσία μακροφάγων (αντιγόνο CD68) πιθανόν οφείλεται στην κυτταροτοξική δράση της λευκοτοξίνης της *M. haemolytica* έναντι αυτού του τύπου των κυττάρων (Zecchinon και συν. 2005). Οι λεμφοκυτταρικοί υποπληθυσμοί (Β-λεμφοκύτταρα, Τ-λεμφοκύτταρα και αντιγόνο-παρουσιαστικά κύτταρα) που αναγνωρίστηκαν στο όριο θηλαίου πόρου - θηλαίου κόλπου τεκμηριώνουν τον αμυντικό ρόλο της θηλής, καθώς α) επιβεβαιώνουν την παρουσία πλασμοκυττάρων [τα οποία

έως τώρα είχαν ταυτοποιηθεί μόνο μορφολογικά σε ιστολογικές τομές (Mavrogianni και συν. 2005, Μαυρογιάννη 2006)], ενισχύοντας την υπόθεση για την ύπαρξη χυμικής ανοσίας στη θηλή και β) καταδεικνύουν το ρόλο της θηλής στην παρουσίαση των αντιγόνων και την ενεργοποίηση - κινητοποίηση των αμυντικών κυττάρων. Η σημαντική αύξηση του αριθμού των T-κυτταροτοξικών κυττάρων (αντιγόνο CD8) από την ημέρα D3 στην ημέρα D5 είναι ενδεικτική της ανάπτυξης της κυτταρικής αμυντικής δραστηριότητας στη θηλή. Τα παραπάνω ευρήματα συνάδουν με τη μείωση της συχνότητας απομόνωσης *M. haemolytica* μετά την ημέρα D3 (13 από τα 20 δείγματα την ημέρα D3, έναντι συνολικά 6 από τα 20 δείγματα τις ημέρες D4 και D5 του πειραματισμού).

Παρατηρήθηκε επίσης αύξηση του αριθμού των λεμφοκυττάρων στα λεμφογάγγλια του ενοφθαλμισμένου ημιμορίου. Συγκεκριμένα, η προοδευτική αύξηση του αριθμού των B-λεμφοκυττάρων (αντιγόνο CD79) και των T-βοηθητικών λεμφοκυττάρων (αντιγόνο CD4) ενισχύει περαιτέρω τη θεωρία της προστατευτικής δράσης των λεμφοκυττάρων κατά της *M. haemolytica*. Άλλωστε, η παρουσία παραγόντων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας 2ης τάξης (αντιγόνο MHC-II), αποδεικνύει την αυξημένη δραστηριότητα αυτών των κυττάρων. Επιπλέον, όσο οι βακτηριακοί πληθυσμοί μειώνονταν, ο αριθμός των μακροφάγων (αντιγόνο CD68) παρουσίαζε αύξηση, μάλλον ως επακόλουθο της προοδευτικής μείωσης της ποσότητας λευκοτοξίνης του βακτηρίου. Τέλος, η αύξηση του αριθμού των T-κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων (αντιγόνο CD8) αποκλειστικά στις θηλές (όχι στα επιχώρια λεμφογάγγλια) υποδηλώνει ότι τα λεμφοκύτταρα στο όριο θηλαίου πόρου - θηλαίου κόλπου ασκούν αυτοδύναμη αμυντική δραστηριότητα, η οποία δεν εξαρτάται από το σύστοιχο οπισθομαστικό λεμφογάγγλιο. Αυτό ενισχύει τη θεωρία για τον τοπικό προστατευτικό ρόλο της θηλής.

Συνέπειες του ενοφθαλμισμού ενός στελέχους *M. haemolytica* από ανώτερη αναπνευστική οδό αρνιού, στη θηλή του μαστού των προβάτων

Σε προηγούμενες πειραματικές μελέτες, χρησιμοποιήθηκαν μόνο στελέχη *M. haemolytica* που είχαν απομονωθεί από ασθενή ή υγιή μαστικό αδέν, για πειραματική πρόκληση μαστίτιδας (El-Masannat 1987, El-Masannat και συν. 1991, Watkins 1990, Watkins & Jones 1992, Mavrogianni και συν. 2005, Μαυρογιάννη 2006). Ανάλογα δεδομένα σχετικά με την πιθανή παθογόνο δράση στελεχών από την ανώτερη αναπνευστική οδό αρνιών για το μαστικό αδέν προβατίνων δεν υπάρχουν. Συνεπώς, προκειμένου να αξιολογηθούν πιθανές διαφορές

στην παθογόνο δράση μεταξύ στελεχών από μαστικό αδένα προβατίνας (= "μαστικά" στελέχη) και από την ανώτερη αναπνευστική οδό αρνιών (= "αναπνευστικά" στελέχη), επιβεβαιώνοντας έτσι τη θεωρία της μετάδοσης του μικροοργανισμού από τα αρνιά στις προβατίνες (Γκουγκουλής 2007, Gougoulis και συν. 2008), είναι απαραίτητη η *in vivo* εξακρίβωση της ικανότητάς τους για πρόκληση μαστίτιδας.

Στην παρούσα μελέτη, δεν προέκυψαν διαφορές στην παθογόνο δράση μεταξύ ενός "μαστικού" και ενός "αναπνευστικού" στελέχους. Το "αναπνευστικό" στέλεχος ενοφθαλμίστηκε στο θηλαίο πόρο προβατίνων και προκάλεσε είτε υποκλινική μαστίτιδα σε ζώα με υγιείς θηλές, είτε κλινική μαστίτιδα σε ζώα με αλλοιώσεις στις θηλές του μαστού. Προκάλεσε επίσης κλινική μαστίτιδα, μετά από απευθείας ενοφθαλμισμό στο γαλακτοφόρο κόλπο προβατίνων. Τα αποτελέσματα του πειραματισμού, συνάδοντας με τις αρχές του Koch, αποδεικνύουν την παθογόνο δράση του "αναπνευστικού" στελέχους. Επιπλέον, επιβεβαιώνουν τον αμυντικό ρόλο της θηλής του μαστού και τη σημασία των παραγόντων προδιάθεσης που μειώνουν την αμυντική ικανότητά της, στην επακόλουθη εκδήλωση κλινικής μαστίτιδας.

Σε πειραματικές μολύνσεις του αναπνευστικού συστήματος προβάτων με αερόλυμα *M. haemolytica* (σε αναλογία δηλαδή του ενοφθαλμισμού του μικροβίου στη θηλή) εκδηλώθηκε κλινική πνευμονία μόνον εφόσον συνυπήρχε κάποιος παράγοντας προδιάθεσης. Για παράδειγμα, βρέθηκε ότι ήταν απαραίτητο να έχει προηγηθεί μόλυνση του ζώου με *Mycoplasma ovipneumoniae* (Buddle, Herceg & Davies 1984, Martin 1996) ή με *Ió Para-influenza 3* (Biberstein, Shreeve, Angus & Thompson 1971, Martin 1996) ή να έχουν δημιουργηθεί συνθήκες καταπόνησης των πειραματοζώων με έκθεσή τους σε ιδιαίτερα χαμηλή θερμοκρασία περιβάλλοντος (Bakima, Kaeckenbeeck, Meniai, Arendt, Lomba & Lekeux 1991) ή να έχει μειωθεί η ανοσολογική ικανότητα του ζώου (Confer 1993). Αντίθετα, η απευθείας ενδοθωρακική έγχυση του μικροοργανισμού (σε αναλογία δηλαδή με τον απευθείας ενοφθαλμισμό του μικροβίου στο γαλακτοφόρο κόλπο του μαστικού αδένος) προκαλούσε πάντοτε πνευμονία (Straus & Purdy 1994, Purdy, Cooley & Straus 1998).

Κατά συνέπεια, τα αποτελέσματα του παρόντος πειραματισμού είναι σε πλήρη αναλογία με τα αντίστοιχα των προαναφερθέντων πειραματισμών που αφορούν σε πειραματική μόλυνση του αναπνευστικού συστήματος. Επιβεβαιώνεται λοιπόν, ότι τα "αναπνευστικά" στελέχη *M. haemolytica* έχουν δυνητικά παθογόνο δράση για τους μαστικούς αδένες των προβατίνων.

Σημασία της βακτηριακής χλωρίδας στο θηλαίο πόρο των προβάτων

Γενικά, η παρουσία πηκτάση-αρνητικών σταφυλοκόκκων ως βακτηριακή χλωρίδα στο μαστικό αδέννα αγελάδων, συσχετίστηκε με μειωμένο ποσοστό προσβολής μετά από πειραματική μόλυνση (Linde και συν. 1980, Rainard & Poutrel 1988, Matthews, Harmon & Smith 1990, Lam, Schukken, van Vliet, Grommers, Tielen & Brand 1997). Μολαταύτα, ανάλογες μελέτες σε πρόβατα δεν έχουν δημοσιευτεί.

Στην παρούσα μελέτη, αρχικά ένα στέλεχος *M. haemolytica* ενοφθαλμίστηκε στο θηλαίο πόρο προβατίνων, όπου προϋπήρχε βακτηριακή χλωρίδα. Έτσι, μελετήθηκαν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της βακτηριακής χλωρίδας και ενός παθογόνου μικροοργανισμού για το μαστικό αδέννα. Προβατίνες με μεγάλο πληθυσμό βακτηριακής χλωρίδας (πηκτάση-αρνητικοί σταφυλόκοκκοι) στη θηλή εκδήλωσαν μεν υποκλινική μαστίτιδα (όπως και οι μάρτυρες), ωστόσο η συχνότητα απομόνωσης του παθογόνου στελέχους που ενοφθαλμίστηκε, ήταν σημαντικά μικρότερη από αυτήν στους μάρτυρες. Αυτό υποδεικνύει ότι υπάρχουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ της βακτηριακής χλωρίδας και του παθογόνου στελέχους. Παράλληλα, η βαρύτητα των αλλοιώσεων στη θηλή και το μαστικό αδέννα ήταν σημαντικά μικρότερη. Με βάση λοιπόν τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, μπορεί κάποιος να εικάσει ότι η βακτηριακή χλωρίδα του θηλαίου πόρου παίζει κάποιο ρόλο στον περιορισμό της παθογόνου δράσης ενός εισβάλλοντος μικροοργανισμού.

Οι βακτηριακοί πληθυσμοί αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, συγκροτώντας μία κοινότητα, όπου κάθε είδος συμβάλλει στη σταθερότητά της. Υπάρχουν αρκετοί μηχανισμοί με τους οποίους πιστεύεται ότι η βακτηριακή χλωρίδα αλληλεπιδρά με τους παθογόνους μικροοργανισμούς, δρώντας ανασταλικά στη δράση τους. Η προσκόλληση της *M. haemolytica* στα μαστικά επιθηλιακά κύτταρα είναι απαραίτητη για την παραγωγή λευκοτοξίνης (Vilela, Fitzpatrick & Morgan 2004). Έτσι, η πιθανή "κατάληψη" των επιθηλιακών κυττάρων από τη μικροβιακή χλωρίδα και, συνακόλουθα, η αποτροπή της προσκόλλησης άλλων, παθογόνων, μικροοργανισμών σε αυτά (Bibel, Aly, Bayles, Strauss, Shinefield & Maibach 1983, Brook 2005) πιθανόν παίζει σημαντικό ρόλο. Οι σταφυλόκοκκοι πολλαπλασιάζονται και σχηματίζουν βιομεμβράνες στα επιθηλιακά κύτταρα, καταλαμβάνοντας έτσι το μεγαλύτερο ποσοστό του πληθυσμού αυτών των κυττάρων (Foster 2005, Melchior, Vaarkamp & Fink-Gremmels 2006). Πιθανόν λοιπόν η αποτροπή του αποικισμού των ιστών από τους παθογόνους μικροοργανισμούς να αποτελεί τον κύριο μηχανισμό, μέσω του οποίου ασκείται η προστατευτική δράση της βακτηριακής χλωρίδας.

Διαφορετικών ειδών βακτηριακοί πληθυσμοί μπορεί να βρίσκονται σε κατάσταση ανταγωνισμού για τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωσή τους, με αποτέλεσμα τη μείωση του αριθμού των κυττάρων τους ή τον ελαττωμένο ρυθμό ανάπτυξής τους (Isenberg & D'Amato 1985). Η βακτηριακή χλωρίδα (πηκτάση-αρνητικοί σταφυλόκοκκοι), καθώς και το στέλεχος που ενοφθαλμίστηκε (*M. haemolytica*), απομονώθηκαν από μικρότερο αριθμό δειγμάτων σε σχέση με τους αντίστοιχους μάρτυρες. Τέτοιου τύπου αλληλεπίδραση μεταξύ βακτηρίων λαμβάνει χώρα όταν δύο βακτηριακά είδη ανταγωνίζονται για τον αποικισμό συγκεκριμένης περιοχής στον ίδιο ιστό (Tsuno, Hidaka & Nishimura 2002, Lina, Boutite, Tristan, Bes, Etienne & Vandenesch 2003). Όλα λοιπόν τα ευρήματα ενισχύουν περαιτέρω την αρχική υπόθεση, σχετικά με τη σημασία του ανταγωνισμού της βακτηριακής χλωρίδας με το στέλεχος που ενοφθαλμίστηκε.

Άλλοι μηχανισμοί που πιθανόν συμβάλλουν στην προστατευτική δράση της βακτηριακής χλωρίδας είναι η παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών από την ίδια τη βακτηριακή χλωρίδα, καθώς και ο ανταγωνισμός για θρεπτικά συστατικά μεταξύ αυτής και των μικροοργανισμών που διεισδύουν (Smith 1995). Έτσι, έχει αναφερθεί η τοξική δράση συγκεκριμένων βακτηρίων κατά άλλων που εισβάλλουν στον ξενιστή, μέσω της παραγωγής αντιβακτηριακών ουσιών (Jack, Tagg, Ray 1995, Daw & Falkiner 1996). Για παράδειγμα, σε *in vitro* μελέτες έχει βρεθεί ότι στελέχη σταφυλοκόκκων που είχαν απομονωθεί από το στόμιο της θηλής του μαστού ή από το γάλα, μπορούσαν να παράγουν βακτηριοσίνες, αναστέλλοντας έτσι το ρυθμό ανάπτυξης άλλων παθογόνων μικροοργανισμών (Martin & Bergmann 1991, De Vliegheer, Opsomer, Vanrolleghem, Devriese, Sampimon, Sol, Barkema, Haesebrouck, de Kruif 2004).

Ο ρόλος της βακτηριακής χλωρίδας στη θηλή του μαστού δεν αφορά αποκλειστικά σε πιθανή αλληλεπίδραση με παθογόνους μικροοργανισμούς, αλλά και στην ενεργοποίηση των αμυντικών μηχανισμών του ξενιστή. Μπορεί κάποιος να υποθέσει ότι εξαιτίας της βακτηριακής χλωρίδας, είχε ήδη αναπτυχθεί κάποια αμυντική διεργασία στη θηλή, η οποία στη συνέχεια συντέλεσε στην έγκαιρη αντιμετώπιση του ενοφθαλμισμένου βακτηρίου. Οι Mavrogianni, Cripps και συν. (2007α) ανέφεραν την παρουσία ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων σε κλινικά υγιείς θηλές, από τις οποίες είχαν απομονωθεί βακτήρια. Έτσι, αποδείχθηκε η ανάπτυξη κυτταρικών αμυντικών μηχανισμών σε θηλές χωρίς τη διείσδυση παθογόνων βακτηρίων. Σε ανάλογες μελέτες στη στοματική κοιλότητα, έχει βρεθεί ότι η παρουσία βακτηριακής χλωρίδας προκαλούσε ανοσολογική αντίδραση με απελευθέρωση κυτοκινών από λεμφοκύτταρα ή μακροφάγα στο στοματικό βλεννογόνο (Ramney 1991). Φαίνεται λοιπόν ότι σε τέτοιες περιπτώσεις, οι αμυντικοί μηχανισμοί είναι ήδη ενεργοποιημένοι και αντιμετωπίζουν με αποτελεσματικότητα τους εισβάλλοντες παθογόνους μικροοργανισμούς.

Όταν για οποιοδήποτε λόγο ανατραπεί η ισορροπία εντός κάποιας μικροβιακής κοινότητας, είναι ενδεχόμενη η αύξηση της λοιμογόνου δράσης των βακτηρίων που την απαρτίζουν, οπότε εκδηλώνεται κλινική ασθένεια. Οι Mayrand και Grenier (1998) μελέτησαν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μελών της βακτηριακής χλωρίδας και διαπίστωσαν ότι, εφόσον διαταραχθεί η μεταξύ τους ισορροπία, μπορεί να εκδηλωθεί κλινική νόσος. Σε αυτές τις συνθήκες, η χλωρίδα συμβάλλει στην εκδήλωση της φλεγμονής είτε υποβοηθώντας την πλήρη έκφραση της λοιμογόνου δράσης κάποιου εισβάλλοντος μικροοργανισμού, είτε συμμετέχοντας αυτή καθαυτή στη διαδικασία της φλεγμονής.

Τα ευρήματα του δεύτερου και του τρίτου πειραματισμού που περιγράφονται στο κεφάλαιο IV, αποδεικνύουν ότι σε συγκεκριμένες συνθήκες η βακτηριακή χλωρίδα του θηλαίου πόρου μπορεί να γίνει παθογόνος για το μαστικό αδέν. Έτσι, προβατίνες με βακτηριακή χλωρίδα στη θηλή του μαστού τους εκδήλωσαν οξεία κλινική μαστίτιδα, χωρίς να έχει λάβει χώρα πειραματικός ενοφθαλμισμός παθογόνου στελέχους. Η νόσος προκλήθηκε από τη προϋπάρχουσα σταφυλοκοκκική βακτηριακή χλωρίδα της θηλής, η οποία πολλαπλασιάστηκε και εισέβαλε στο μαστικό παρέγχυμα. Τα μακροσκοπικά και μικροσκοπικά παθολογικά ευρήματα που παρατηρήθηκαν, ήταν χαρακτηριστικά της σταφυλοκοκκικής μαστίτιδας (Fthenakis & Jones 1990β). Στην περίπτωση αυτήν, ο παράγοντας που οδήγησε στη μεταβολή της υφιστάμενης ισορροπίας στους βακτηριακούς πληθυσμούς ήταν η πρόκληση δερματικών αλλοιώσεων στη θηλή του μαστού.

Το στέλεχος πηκτάση-αρνητικού σταφυλοκόκκου που χρησιμοποιήθηκε για ενοφθαλμισμό (3ος πειραματισμός), είχε μεν απομονωθεί από το θηλαίο πόρο μίας κλινικά υγιούς προβατίνας, αποδείχθηκε όμως παθογόνο για το μαστικό αδέν μετά από απευθείας ενοφθαλμισμό στο γαλακτοφόρο κόλπο. Το εύρημα αυτό επιβεβαιώνει ότι στο ζώο από το οποίο αρχικά απομονώθηκε το εν λόγω στέλεχος, είχε διαμορφωθεί μία κατάσταση ισορροπίας μεταξύ των αμυντικών μηχανισμών του και των βακτηρίων. Όταν όμως ο μικροοργανισμός ενοφθαλμίστηκε απευθείας στο γαλακτοφόρο κόλπο, εκδηλώθηκε κλινική μαστίτιδα. Αντίθετα, ο ενοφθαλμισμός του ίδιου στελέχους σε κλινικά υγιείς θηλές δεν προκάλεσε κλινική νόσο, γεγονός που επιβεβαιώνει τη γενική υπόθεση για τον αμυντικό ρόλο της θηλής.

Με τους πειραματισμούς που περιγράφηκαν στο κεφάλαιο II, αποδείχθηκε η σημασία των αλλοιώσεων στη θηλή του μαστού για τον αποικισμό του θηλαίου πόρου από βακτήρια και στην περαιτέρω διείσδυσή τους στο μαστικό αδέν. Τα ευρήματα των πειραματισμών που περιγράφηκαν στο κεφάλαιο IV, επιβεβαιώνουν ότι οι αλλοιώσεις στη θηλή επιδρούν στους αμυντικούς μηχανισμούς του μαστικού αδέν, προδιαθέτοντας σε μαστίτιδα. Στο δέρμα με αλλοιώσεις, υπάρχει μειωμένη ανταπόκριση και ελαττωματική χημειοτακτική ικανότητα των

ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων (Cheville 1994). Επιπλέον, τα κύτταρα αυτά καταστρέφονται σε ιδιαίτερα όξινο pH και σε αυξημένη θερμοκρασία, που παρατηρούνται σε φλεγμονή (όπως δηλαδή σε περιπτώσεις αλλοιώσεων στη θηλή) (Jacques & Bainton 1978, Harlan, Schwartz, Reidy, Schwartz, Ochs & Harker 1985). Προφανώς, επέρχεται μεταβολή της ισορροπίας μεταξύ των διαφόρων βακτηριακών πληθυσμών, εισβολή τους στο θηλαίο πόρο και, τελικά, εκδήλωση μαστίτιδας. Τέλος, η έκθεση των θηλών σε τραυματισμούς ή σε χαμηλή θερμοκρασία περιβάλλοντος προκαλεί επίσης καταστροφή των κοκκίων των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων και λύση των σιτευτικών κυττάρων (Henderson, Chi & Klebanoff 1980), τα οποία παίζουν αμυντικό ρόλο στα αρχικά στάδια της φλεγμονής (Galli, Dvorak & Dvorak 1984).

Μπορεί λοιπόν, κάποιος να εικάσει ότι σε συνθήκες εκτροφής, καθώς επηρεάζεται η γενική ανοσολογική κατάσταση του ζώου, πιθανόν μεταβάλλονται και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μελών της βακτηριακής χλωρίδας στη θηλή, οπότε εκδηλώνεται μαστίτιδα. Άλλο χαρακτηριστικό παράδειγμα νόσου, όπου η προϋπάρχουσα βακτηριακή χλωρίδα μπορεί να γίνει παθογόνος μετά τη δράση διαφόρων παραγόντων είναι η εντεροτοξιναιμία (Lewis 2000).

Πειραματικός ενοφθαλισμός *M. haemolytica* στη θηλή του μαστού προβάτων δύο διαφορετικών φυλών

Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενες μελέτες (Μαυρογιάννη 2006) και σε προηγούμενα κεφάλαια της παρούσας διατριβής, οι λεμφοειδείς δομές στη θηλή φαίνεται ότι παίζουν σημαντικό αμυντικό ρόλο. Στο κεφάλαιο VI αξιολογήθηκε το ενδεχόμενο διαφορετικού βαθμού ευαισθησίας των δύο φυλών -της Καραγκούνικης και της φυλής Frisarta- στη μαστίτιδα από *M. haemolytica*. Τα αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι τα ζώα της φυλής Frisarta είναι περισσότερο ευαίσθητα στη νόσο σε σχέση με τις προβατίνες της Καραγκούνικης φυλής.

Καθώς δεν παρατηρήθηκαν συναθροίσεις λεμφοκυττάρων στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου των ζώων της φυλής Frisarta, μπορεί να θεωρηθεί ότι η απουσία τους συνέβαλε στην ανάπτυξη κλινικής μαστίτιδας. Η ευαισθησία των ζώων αυτών στη μαστίτιδα συμπίπτει με τα βιβλιογραφικά δεδομένα που αναφέρουν γενικότερη ευαισθησία τους σε αναπνευστικές λοιμώξεις (Christodouloulopoulos & Fthenakis 2005).

Για ορισμένους από τους αμυντικούς μηχανισμούς που συμμετέχουν στην άμυνα του μαστικού αδένος των αγελάδων, έχει αναφερθεί ενδεχόμενη κληρονομησιμότητα. Συγκεκριμένα, ο αριθμός των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων στο αίμα (Dettloux, Koehler, Freeman, Kehrli & Kelley 1994), η συγκέντρωση της γαλακτοσιδινής στο γάλα (Schwerin, Solinas-Toldo, Eggen,

Bruner, Seyfert & Fries 1994), η παραγωγή ανοσοσφαιρινών στους ιστούς του μαστού (Kelm, Detilleux, Freeman, Kehrl, Dietz, Fox, Butler, Kasckovics & Kelley 1997), η ενεργοποίηση του συμπληρώματος σε περίπτωση μαστίτιδας (Shuster, Kehrl, Rainard & Paape 1997), η παραγωγή και η κινητοποίηση κυτοκινών (McShane, Gallagher, Newkirk, Taylor, Burzlaff, Davis & Skow 2001), θεωρούνται ότι επηρεάζονται από το γενετικό υπόβαθρο του ζώου. Ειδικά για τον αμυντικό ρόλο των λεμφοκυττάρων, έχει καταγραφεί μεγάλος δείκτης κληρονομησιμότητας (h^2) του ρυθμού πολλαπλασιασμού των Τ-λεμφοκυττάρων (έως 0,40) (Detilleux και συν. 1994) και της παραγωγής Τ-λεμφοκυττάρων και Β-λεμφοκυττάρων (Saini, Allore, Jacobs & Kaushik 1999). Επίσης, έχουν αναφερθεί γενετικές διαφορές μεταξύ αγελάδων στη δραστηριότητα του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC), το οποίο συμβάλλει στην αμυντική ικανότητα των ζώων έναντι της μαστίτιδας (Takeshima & Aida 2006).

Αντίθετα, στα πρόβατα τα διαθέσιμα στοιχεία είναι πολύ λιγότερα και γενικά αντιφατικά. Έχουν αναφερθεί ατομικές διαφορές μεταξύ ζώων σε ό,τι αφορά στο γενετικό πολυμορφισμό του MHC (Swiderek, Charon, Winnicka & Gruszczynska 2006). Οι Baro, Carriedo και San Primitivo (1994) ανέφεραν μικρού βαθμού κληρονομησιμότητα στον αριθμό των σωματικών κυττάρων στο γάλα, ενώ αντίθετα οι Barillet, Rupp, Mignon-Grasteau, Astruc και Jacquin (2001) θεώρησαν δυνατή την επιλογή ζώων ανθεκτικών στη μαστίτιδα με βάση τον αριθμό των σωματικών κυττάρων. Άλλοι ερευνητές (Watson, Franklin, Davies, Kettlewell & Frost 1990, Gonzalez-Rodriguez, Gonzalo, San Primitivo & Carmenes 1995, Burriel 1997β) έχουν επίσης καταγράψει διαφορές μεταξύ φυλών προβάτων στην ευαισθησία τους στη μαστίτιδα. Για παράδειγμα, προβατίνες της βελτιωμένης φυλής Mule θεωρούνται πιο ευαίσθητες από τις προβατίνες της αυτόχθονης φυλής Welsh-Mountain (Burriel 1997β).

Μπορεί λοιπόν να υποτεθεί ότι οι διαφορές που παρατηρήθηκαν μεταξύ των δύο φυλών σε ό,τι αφορά στην εκδήλωση μαστίτιδας, ίσως οφείλονταν σε διαφορές στους αμυντικούς μηχανισμούς της θηλής, υποδεικνύοντας το ενδεχόμενο γενετικού υποβάθρου στην ευαισθησία των προβάτων στη μαστίτιδα. Οπωσδήποτε, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την εξακρίβωση κατά πόσον αυτό το εύρημα αποτελεί πραγματική γονιδιακή διαφορά μεταξύ των φυλών ή απλή διαφορά μεταξύ οικογενειών ζώων.

Σημασία των λεμφοκυττάρων στη θηλή

Το σύνολο των παραπάνω ευρημάτων υπογραμμίζει τη σημασία των λεμφοκυττάρων στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου για την άμυνα του μαστικού αδένος. Τα

Λεμφοκύτταρα αυτά αναπτύσσονται σε "στρατηγικό" σημείο, στο βλεννογόνο στην είσοδο του θηλαίου κόλπου, παρέχοντας προστασία κατά των εισβαλλόντων μικροοργανισμών.

Γενικά, οι λεμφοειδείς ιστοί στους βλεννογόνους (mucosa-associated-lymphoid-tissue, MALT) αποτελούνται από συσσωματώματα κυττάρων, που προέρχονται από τα κύρια λεμφικά όργανα. Είναι δευτερογενή λεμφικά όργανα, τα οποία είχαν ενεργοποιηθεί από διάφορα αντιγονικά ερεθίσματα στο παρελθόν και είναι ιδιαίτερα ενεργά μετά από επαναλαμβανόμενες εκθέσεις σε αντιγονικά ερεθίσματα (Moyron-Quiroz, Rangel-Moreno, Kusser, Hartson, Sprague, Goodrich, Woodland, Lund & Randall 2004). Σε περίπτωση μόλυνσης, λαμβάνει χώρα δευτερογενής ανάπτυξη συναθροίσεων λεμφοκυττάρων στα επιθήλια, μέσω της ενεργοποίησης, της μετανάστευσης και της διασποράς στους ιστούς, λεμφοκυττάρων ειδικών για συγκεκριμένα αντιγόνα. Αυτοί οι σχηματισμοί συμμετέχουν στις επακόλουθες ανοσολογικές αντιδράσεις. Η δραστηριοποίησή τους αρχίζει, οπότε αυξάνεται και το μέγεθός τους, ως ανταπόκριση σε κάποιο αντιγονικό ερέθισμα στο βλεννογόνο, συμπεριλαμβανομένης και της βακτηριακής χλωρίδας.

Στα πρόβατα, η παρουσία λεμφοειδών δομών των βλεννογόνων έχει περιγραφεί σε διάφορα σημεία του σώματος, όπως στο έντερο [πλάκες Peyer και όριο ορθού-κόλου (Dagleish, Gonzalez, Finlayson, Steel, Jeffrey & Reid 2005)], στις αμυγδαλές (Cocquyt, Baten, Simoens & Van Den Broeck 2005), στο ρινικό βλεννογόνο, στους βρόγχους και στον επιπεφυκότα (McNeilly και συν. 2008). Θεωρείται ότι αυτές οι λεμφοειδείς δομές λειτουργούν ως περιοχές του ανοσοποιητικού συστήματος στους βλεννογόνους, προάγοντας έτσι τη συγκέντρωση και την αύξηση του αριθμού των ειδικών λεμφοκυττάρων.

Κατ' αναλογία, το επιθήλιο του θηλαίου πόρου βρίσκεται μεταξύ του μαστικού αδένος και του εξωτερικού περιβάλλοντος. Οι συναθροίσεις λεμφοκυττάρων στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου αναπτύσσονται και δραστηριοποιούνται, παρέχοντας προστασία έναντι των μικροοργανισμών που διεισδύουν στη θηλή. Η παρουσία τους αποτελεί ένδειξη της αμυντικής δυνατότητας της περιοχής.

Παραδοσιακά, τα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα θεωρούνται σημαντικός αμυντικός μηχανισμός στο μαστικό αδένος. Ωστόσο, σε περιπτώσεις προσβολής του από βακτήρια, όπως η *M. haemolytica*, τα οποία έχουν χαρακτηριστική τοξική δράση εναντίον των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων (Zecchinon και συν. 2005), αυτά δεν μπορούν να παράσχουν επαρκή προστασία. Φαίνεται λοιπόν ότι σε τέτοιες περιπτώσεις, τα λεμφοκύτταρα διαδραματίζουν εξίσου σημαντικό αμυντικό ρόλο. Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν επίσης ότι ο μαστικός αδένος μπορεί να οργανώσει τοπική ανοσολογική αντίδραση, στην οποία εμπλέκονται κυρίως τα T-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα. Φαίνεται λοιπόν ότι οι συναθροίσεις

λεμφοκυττάρων στο επιθήλιο της θηλής παρουσιάζουν σημαντικές ομοιότητες με "ενεργοποιημένα λεμφοειδή θυλάκια" (inducible-lymphoid-follicles).

Γενικά, τα ενεργοποιημένα λεμφοειδή θυλάκια περιέχουν λεμφοκύτταρα και αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, όπως άλλωστε διαπιστώθηκε και στις συναθροίσεις λεμφοκυττάρων στη θηλή. Επίσης, πιστεύεται ότι παράγουν πλασμοκύτταρα. Στα ενεργοποιημένα λεμφοειδή θυλάκια ανευρίσκονται βλαστικά κέντρα ως αποτέλεσμα λεμφοκυτταρικής ενεργοποίησης εξαιτίας εισόδου μικροοργανισμών (Murakami, Shimizu, Kashi, Kato, Minemura, Okada, Nambu, Takahara, Higuchi, Maeda, Kumada & Watanabe 1999, Casola & Rajewsky 2006).

Με βάση λοιπόν τα παραπάνω ευρήματα, διαφαίνεται ότι πιθανόν ο λεμφικός ιστός στη θηλή των προβατίνων είναι παρόμοιος φύσης με τα ενεργοποιημένα λεμφοειδή θυλάκια που έχουν περιγραφεί στο λεπτό έντερο ανθρώπων και τρωκτικών (Lorenz, Chaplin, McDonald, McDonough & Newberry 2003, Newberry & Lorenz 2005). Σημειώνεται πάντως ότι τα ενεργοποιημένα λεμφοειδή θυλάκια γενικά δεν έχουν μελετηθεί όσο άλλες λεμφοειδείς δομές των βλεννογόνων.

Οι Kraft, Bachmann, Bachmann, Buerki, Hess, Cottier και Stoner (1987) ανέφεραν ότι η λειτουργικότητα των δευτερογενών λεμφικών οργάνων μειώνεται με την πάροδο της ηλικίας. Η αύξηση του ποσοστού προσβολής των προβατίνων από μαστίτιδα έχει συσχετιστεί με την πάροδο της ηλικίας και τον αριθμό της γαλακτικής περιόδου (Bergonier & Berthelot 2003). Καθώς δεν έχει βρεθεί διαφορά στην πιθανότητα μόλυνσης της θηλής και του μαστικού αδένος μεταξύ πρωτοτόκων και πολυτόκων προβατίνων (Μαυρογιάννη 2006, Mavrogianni, Cripps & Fthenakis 2007), μάλλον τα αίτια σχετίζονται με την αμυντική ικανότητα της θηλής και του μαστικού αδένος. Έτσι, πιθανόν αυτή η αύξηση οφείλεται σε ανεπάρκεια των αμυντικών κυτταρικών μηχανισμών της θηλής, ακριβώς λόγω της μειωμένης λειτουργικότητας αυτών των λεμφοειδών δομών με την πάροδο της ηλικίας των ζώων.

Η εγγενής αμυντική σημασία του σχηματισμού αποδεικνύεται από την παρατήρηση λεμφοκυττάρων και δομών που έμοιαζαν με λεμφοειδή θυλάκια στις θηλές αμνάδων, δηλαδή ζώων των οποίων ο μαστικός αδένος δεν είχε λειτουργήσει.

Λαμβάνοντας υπόψη τις διαφορές τουλάχιστον μεταξύ φυλών (κεφάλαιο VI) μπορεί να υποθεθεί ότι εγγενείς διαφορές μεταξύ των ζώων καθορίζουν την ανταπόκρισή τους σε ενδεχόμενη λοίμωξη. Άλλωστε, στον πρώτο πειραματισμό του κεφαλαίου III αναγνωρίστηκε η σημασία των παραγόντων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας 2ης τάξης (αντιγόνο MHC-II) στην τοπική άμυνα της θηλής. Τα αποτελέσματα συνάδουν με αυτά πρόσφατων μελετών, όπου βρέθηκαν γενετικές διαφορές μεταξύ αγελάδων (Takeshima & Aida 2006) και

προβάτων (Swiderek και συν. 2006) στη δραστηριότητα του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας. Πιθανόν αυτές οι διαφορές αντικατοπτρίζονται στην ευαισθησία κάποιων ζώων και την ανθεκτικότητα κάποιων άλλων.

Όλα τα ευρήματα της παρούσας διατριβής ενισχύουν την υπόθεση ότι η θηλή μπορεί να αναπτύξει τοπική ανοσολογική ανταπόκριση. Η ανοσολογική ανταπόκριση που αναπτύσσεται τοπικά στους ιστούς, έχει αποδειχθεί αποτελεσματική, λειτουργεί όμως διαφορετικά από αυτήν που αναπτύσσεται σε πρωτογενή λεμφικά όργανα (Moyron-Quiroz και συν. 2004).

Οι παραδοσιακές μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί για την προστασία των προβάτων από μαστίτιδα με εμβολιασμό των ζώων θεωρούνται ανεπιτυχείς (Menzies & Ramapoon 2001). Πιθανόν, εμβόλια που θα αποσκοπούσαν στη βελτίωση της ανοσολογικής ανταπόκρισης στους βλεννογόνους θα μπορούσαν να παράσχουν πιο αποτελεσματική άμυνα κατά των μικροοργανισμών (Moyron-Quiroz και συν. 2004, Newberry & Lorenz 2005).

Συμπεράσματα

Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από τα ευρήματα αυτής της διατριβής είναι τα παρακάτω.

(α) Τα λεμφοκύτταρα αποτελούν σημαντικό αμυντικό μηχανισμό της θηλής του μαστού των προβάτων.

- Οι περιοχές συνάθροισης λεμφοκυττάρων στις θηλές φαίνεται ότι αποτελούν ενεργοποιημένα λεμφοειδή θυλάκια (inducible-lymphoid-follicles).
- Η παρουσία πλασμοκυττάρων επιβεβαιώνει τη συμμετοχή χυμικής ανοσίας στη θηλή. Η παρατήρηση λεμφοκυττάρων και δομών που έμοιαζαν με λεμφοειδή θυλάκια στις θηλές αμνάδων ενισχύει την άποψη για τον εγγενή χαρακτήρα του αμυντικού αυτού σχηματισμού.
- Φαίνεται ότι υπάρχουν διαφορές μεταξύ φυλών στην ενεργοποίηση και τη λειτουργία των λεμφοειδών θυλακίων, οι οποίες καταδεικνύουν διαφορές στην ευαισθησία των ζώων μεταξύ τους.

(β) Δεν υπάρχουν διαφορές στην παθογόνο δράση μεταξύ στελεχών *M. haemolytica* που απομονώθηκαν από μαστό προβατίνων ("μαστικά" στελέχη) και στελεχών *M. haemolytica* που απομονώθηκαν από ανώτερη αναπνευστική οδό αρνιών ("αναπνευστικά" στελέχη).

- Σε ευνοϊκές συνθήκες, "αναπνευστικά" στελέχη του βακτηρίου μπορούν να διεισδύσουν στο μαστικό αδένα.

- Τέτοια στελέχη μπορούν να προκαλέσουν ποικίλου βαθμού μαστίτιδα, ανάλογα με την κατάσταση των αμυντικών μηχανισμών της θηλής.
- Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζουν τη θεωρία για μετάδοση του βακτηρίου από το αρνί στη μητέρα του κατά το θηλασμό.

(γ) Η βακτηριακή χλωρίδα που βρίσκεται στο θηλαίο πόρο, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της ασθένειας.

- Η βακτηριακή χλωρίδα στη θηλή μπορεί να παράσχει κάποιου βαθμού προστασία κατά των εισβαλλόντων μικροοργανισμών.
- Σε περίπτωση μείωσης της αμυντικής ικανότητας της θηλής, η βακτηριακή χλωρίδα της μπορεί να διεισδύσει στο μαστικό παρέγχυμα και να προκαλέσει κλινική μαστίτιδα.

Προτάσεις για περαιτέρω ερευνητική δραστηριότητα, ως συνέχεια των ευρημάτων της παρούσας διατριβής, είναι οι παρακάτω.

- Η αξιοποίηση των αμυντικών μηχανισμών της θηλής, πιθανόν με ανοσοενίσχυση, για την πρόληψη της μαστίτιδας.
- Η ταυτοποίηση γενετικών διαφορών μεταξύ των ζώων, οι οποίες αφορούν στους αμυντικούς μηχανισμούς της θηλής.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

- Γκουγκουλής ΔΑ (2007). *Αλληλεπιδράσεις Συμπεριφοράς Θηλασμού Αρνιών και Μόλυνσης του Μαστικού Αδένα σε Προβατίνες*. Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- Κοπτόπουλος ΓΣ (1993). *Στοιχεία Κτηνιατρικής Ανοσολογίας*, 3η έκδ. Αφοί Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη.
- Μαυρογιάννη ΒΣ (2006). *Προστατευτικός Ρόλος της Θηλής και Σημασία των Παθήσεών της στην Εκδήλωση Μαστίτιδας από Mannheimia haemolytica σε Πρόβατα*. Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- Μαυρογιάννη ΒΣ, Φθενάκης ΓΧ (2004). Αμυντικοί μηχανισμοί στο μαστικό αδένα των αγελάδων. *Περιοδικό της ελληνικής κτηνιατρικής Εταιρείας* 55:235-246.
- Μιχαήλ ΣΓ (1990). *Συγκριτική Ανατομική των Κατοικίδιων Θηλαστικών*, 2η έκδ. Αφοί Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη.
- Φθενάκης ΓΧ (1993). *Φυσιοπαθολογία του Μαστικού Αδένα των Προβάτων*. Αγροτικές Εκδόσεις, Αθήνα.
- Adams EW, Rickard CG, Murphy JM (1961). Some histological and histochemical observations on bovine teat canal epithelium. *Cornell Veterinarian* 51:124-154.
- Aitken ID (2007). *Diseases of Sheep*, 4th edn. Blackwell, Oxford.
- Al-Majali AM, Jawabreh S (2003). Period prevalence and etiology of subclinical mastitis in Awassi sheep in southern Jordan. *Small Ruminant Research* 47:243-248.
- Al-Sultan II, Aitken ID (1985). The tonsillar carriage of Pasteurella haemolytica in lambs. *Journal of comparative Pathology* 95:193-201.
- Anderson KL, Smith AR, Shanks RD, Whitmore HL, Davis LE, Gustafsson BK (1986). Endotoxin-induced bovine mastitis: immunoglobulins, phagocytosis, and effect of flunixin meglumine. *American Journal of veterinary Research* 47:2405-2410.
- Ariznabarreta A, Gonzalo C, San Primitivo F (2002). Microbiological quality and somatic cell count of ewe milk with special reference to staphylococci. *Journal of Dairy Science* 85:1370-1375.
- Baggiolini M, Horisberger U, Gennaro R, Dewald B (1985). Identification of three types of granules in neutrophils of ruminants. Ultrastructure of circulating and maturing cells. *Laboratory Investigation* 52:151-158.

- Baggiolini M, Mauderli P, Näf U, Catanese B (1985). Effect of benzydamine on exocytosis and respiratory burst in human neutrophils and mononuclear phagocytes. *Agents and Actions* 16:346-352.
- Bakima M, Kaeckenbeeck A, Meniai K, Arendt J, Lomba F, Lekeux P (1991). Experimental induction of pneumonic pasteurellosis in goats - Study of physiopathological changes. *Annales de Medecine veterinaire* 135:431-436.
- Barillet F, Rupp R, Mignon-Grasteau S, Astruc JM, Jacquin M (2001). Genetic analysis for mastitis resistance and milk somatic cell score in French Lacaune dairy sheep. *Genetique-Selection-Evolution* 33:397-415.
- Baro JA, Carriedo JA, San Primitivo F (1994). Genetic parameters of test day measure for somatic cell count, milk yield and protein percentage of milking ewes. *Journal of Dairy Science* 77:2568-2662.
- Barrow GI, Feltham RKA (1993). *Manual for the Identification of Medical Bacteria*, 3rd edn. Cambridge University Press, Cambridge.
- Baxter ES, Clarke PM, Dodd FH, Foot AS (1950). Factors affecting the rate of machine milking. *Journal of Dairy Research* 17:117-127.
- Bergonier D, Berthelot X (2003). New advances in epizootiology and control of ewe mastitis. *Livestock Production Science* 79:1-16.
- Bergonier D, De Cremoux R, Rupp R, Lagriffoul G, Berthelot X (2003). Mastitis of dairy small ruminants. *Veterinary Research* 34:689-716.
- Berthelot X, Lagriffoul G, Concordet D, Barillet F, Bergonier D (2005). Physiological and pathological thresholds of somatic cell counts in ewe milk. *Proceedings of the 6th International Sheep Veterinary Congress*, Hersonissos, Greece, pp. 40-43.
- Bibel DJ, Aly R, Bayles C, Strauss WG, Shinefield HR, Maibach HI (1983). Competitive adherence as a mechanism of bacterial interference. *Canadian Journal of Microbiology* 29:700-703.
- Biberstein EL, Shreeve BJ, Angus KW, Thompson DA (1971). Experimental pneumonia of sheep. Clinical, microbiological and pathological responses to infection with Myxovirus parainfluenzae 3 and Pasteurella haemolytica. *Journal of comparative Pathology* 81:339-351.
- Bochsler PN, Slauson DO (2002). Inflammation and repair of tissue. In: DO Slauson, BJ Cooper (eds) *Mechanisms of Disease. A Textbook of Comparative General Pathology*, 3rd edn. Mosby, St Louis, pp. 140-245.

- Bramley AJ (1992). Milk hygiene and machine milking. In: AJ Bramley, FH Dodd, GA Mein, JA Bramley (eds) *Machine Milking and Lactation*. Insight Books, Berkshire, pp. 343-372.
- Bramley AJ, Godinho KS, Grindal RJ (1981). Evidence of penetration of the bovine teat duct by *Escherichia coli* in the interval between milkings. *Journal of Dairy Research* 48:379-386.
- Brook I (2005). The role of bacterial interference in otitis, sinusitis and tonsillitis. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery* 133:139-146.
- Brown TT Jr, Suter MM, Slauson DO (2002). Immunopathology. In: DO Slauson, BJ Cooper (eds) *Mechanisms of Disease. A Textbook of Comparative General Pathology*, 3rd edn. Mosby, St Louis, pp. 246-297.
- Buddle BM, Herceg M, Davies DH (1984). Experimental infection of sheep with *Mycoplasma ovipneumoniae* and *Pasteurella haemolytica*. *Veterinary Microbiology* 9:543-548.
- Burmeister JE, Fox LK, Hancock DD, Gay CC, Gay JM, Parish SM, Tyler JW (1995). Survey of dairy managers in the Pacific Northwest identifying factors associated with teat chapping. *Journal of Dairy Science* 78:2073-2082.
- Burriel AR (1997α). Dynamics of intramammary infection in the sheep caused by coagulase-negative staphylococci and its influence on udder tissue and milk composition. *The veterinary Record* 140:419-423.
- Burriel AR (1997β). Evidence of breed susceptibility to experimentally produced ovine subclinical mastitis. *Sheep and Goat Research Journal* 13:20-23.
- Bush BM (1993). *Interpretation of Laboratory Results for Small Animal Clinicians*. Blackwell, Oxford.
- Cannistra SA, Griffin JD (1988). Regulation of the production and function of granulocytes and monocytes. *Seminars in Hematology* 25:173-188.
- Capuco AV, Bright SA, Pankey JW, Wood DL, Miller RH, Bitman J (1992). Increased susceptibility to intramammary infection following removal of teat canal keratin. *Journal of Dairy Science* 75:2126-2130.
- Casola S, Rajewsky B (2006). B cell recruitment and selection in mouse GALT germinal centers. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 308:155-171.
- Chensue SW, Terebuh PD, Remick DG, Scales WE, Kunkel SL (1991). In vivo biologic and immunohistochemical analysis of interleukin-1 alpha, beta and tumor necrosis factor during experimental endotoxemia. Kinetics, Kupffer cell expression, and glucocorticoid effects. *American Journal of Pathology* 138:395-402.

- Cheville NF (1994). *Ultrastructural Pathology: An Introduction to Interpretation*. Iowa State University Press, Ames.
- Christodouloupoulos G, Fthenakis GC (2005). Respiratory infections in young lambs in Greece: status and field experience with their control. *Proceedings of the 6th International Sheep Veterinary Congress*, Hersonissos, Greece, pp. 161-163.
- Clark RG (1972). Field observations on ovine mastitis. *Proceedings of the 2nd Seminar of the New Zealand Veterinary Association Sheep and Beef Cattle Society*, Palmerston North, New Zealand, pp. 47-54.
- Cocquyt G, Baten T, Simoens P, Van Den Broeck W (2005). Anatomical localisation and histology of the ovine tonsils. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 107:79-86.
- Collins RA, Oldham G (1986). Proliferative responses and IL-2 production by mononuclear-cells from bovine mammary secretions, and the effect of mammary secretions on peripheral-blood lymphocytes. *Immunology* 58:647-651.
- Collins RA, Parsons KR, Field TR, Bramley AJ (1988). Histochemical localization and possible antibacterial role of xanthine oxidase in bovine mammary gland. 55:25-32.
- Comali MP, Eberhart RJ, Griel LC Jo, Rotheabacher H (1984). Changes in the macroscopic anatomy of the bovine teat canal during mammary involution. *American Journal of veterinary Research* 45:2236-2242.
- Confer AW (1993). Immunogens of *Pasteurella*. *Veterinary Microbiology* 37:353-368.
- Craven N, Williams MR (1985). Defences of the bovine mammary gland against infection and prospects for their enhancement. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 10:71-127.
- Cuccuru C, Moroni P, Zecconi A, Casu S, Caria A, Contini A (1997). Milk differential cell counts in relation to total counts in Sardinian ewes. *Small Ruminant Research* 25:169-173.
- Dagleish MP, Gonzalez L, Finlayson J, Steel P, Jeffrey M, Reid HM (2005). PrPd detection in recto-anal mucosal associated lymphoid tissue in sheep. *Proceedings of the 6th International Sheep Veterinary Congress*, Hersonissos, Greece, pp. 167-168.
- Daley MJ, Williams T, Dougherty R, Furda G, Hayes P, Coyle P (1993). Prevention and therapy of *Staphylococcus aureus* infections with recombinant cytokines. *Cytokine* 5:276-283.
- Daw MA, Falkiner FR (1996). Bacteriocins: nature function and structure. *Micron* 27:467-479.
- Delannoy I, Lekeux P, Miossec P (1993). Cytokine and anti-cytokine strategies in inflammatory reaction modulation. *Veterinary Research* 24:449-467.
- Detilleux JC (2002). Genetic factors affecting susceptibility of dairy cows to udder pathogens. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 88:103-110.

- Detilleux JC, Koehler KJ, Freeman AEF, Kehrli Jr ME, Kelley DH (1994). Immunological parameters of periparturient Holstein cattle genetic variation. *Journal of Dairy Science* 77:2640-2645.
- De Vlieghe S, Opsomer G, Vanrolleghem A, Devriese LA, Sampimon OC, Sol J, Barkema HW, Haesebrouck F, de Kruif A (2004). In vitro growth inhibition of major mastitis pathogens by *Staphylococcus chromogenes* originating from teat apices of dairy heifers. *Veterinary Microbiology* 101:215-221.
- Dodd FH, Neave FK (1951). Machine milking rate and mastitis. *Journal of Dairy Science* 18:240-245.
- Doherty ML, Bassett HP (1989). Staphylococcal dermatitis in sheep. *The veterinary Record* 124:470.
- Doymaz MZ, Sordillo LM, Oliver SP, Guidry AJ (1988). Effects of *Staphylococcus aureus* mastitis on bovine mammary gland plasma cell populations and immunoglobulin concentration in milk. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 20:87-93.
- El-Masannat ETS (1987). *Ovine Mastitis with Special Reference to Mastitis caused by Pasteurella haemolytica*. Ph.D. thesis, The Royal Veterinary College, University of London.
- El-Masannat ETS, Jones JET, Scott MJ (1991). The experimental production of mastitis in sheep by intramammary inoculation of *Pasteurella haemolytica*. *Journal of comparative Pathology* 105:455-465.
- El-Saied UM, Carriero JA, San Primitivo F (1998). Heritability of test day somatic cell counts and its relationship with milk yield and protein percentage in dairy ewes. *Journal of Dairy Science* 81:2956-2961.
- Euzeby JP (1997). List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet. *International Journal of systematic Bacteriology* 47:590–592 (list of prokaryotic names with standing in nomenclature, URL: <http://www.bacterio.net>).
- Farnsworth RJ (1996). Observations on teat lesions. *Proceedings of Annual Meeting of National Mastitis Council* p. 93.
- Foster TJ (2005). Immune evasion by staphylococci. *Nature Reviews Microbiology* 3:948–958.
- Fox LK, Cumming MS (1995). Relationship between thickness, chapping and *Staphylococcus aureus* colonization of bovine teat tissue. *Journal of Dairy Research* 63:369-375.
- Fox LK, Hancock DD (1989). Effect of segregation on prevention of intramammary infections by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Dairy Science* 72:540-544.

- Fox LK, Nagy JA, Hillers JK, Cronrath JD, Ratkowsky DA (1991). Effects of postmilking teat treatment on the colonization of *Staphylococcus aureus* on chapped teat skin. *American Journal of veterinary Research* 52:799-802.
- Francis PG (1984). Teat skin lesions and mastitis. *British veterinary Journal* 140:430-436.
- Franz S, Hofmann-Parisot M, Gutler S, Baumgartner W (2003). Clinical and ultrasonographic findings in the mammary gland of sheep. *New Zealand veterinary Journal* 51:238-243.
- Fthenakis GC (1994). Prevalence and aetiology of subclinical mastitis in ewes of southern Greece. *Small Ruminant Research* 13:293-300.
- Fthenakis GC (1995). California Mastitis Test and Whiteside Test in diagnosis of subclinical mastitis in dairy ewes. *Small Ruminant Research* 16:271-276.
- Fthenakis GC (1996). Somatic cell counts in milk of Welsh-Mountain, Dorset-Horn and Chios ewes throughout lactation. *Small Ruminant Research* 20:155-162.
- Fthenakis GC, Jones JET (1990α). The effect of experimentally induced subclinical mastitis on the milk yield of ewes and on the growth of lambs. *British veterinary Journal* 146:43-49.
- Fthenakis GC, Jones JET (1990β). The effect of inoculation of coagulase negative staphylococci into the ovine mammary gland. *Journal of comparative Pathology* 102:211-219.
- Fthenakis GC, Marples RR, Richardson JF, Jones JET (1994). Some properties of coagulase negative staphylococci isolated from cases of ovine mastitis. *Epidemiology and Infection* 112:171-176.
- Galli SJ, Dvorak AM, Dvorak HF (1984). Basophils and mast cells. Morphologic insights into their biology, secretory patterns and function. *Progress in Allergy* 34:1-141.
- Geishauser T, Querengasser K (2000). Investigations on teat canal length in teats with milk flow disturbances. *Journal of Dairy Science* 83:1976-80.
- Gennaro R, Dewald B, Horisberger U, Gubler HU, Baggiolini M (1983). A novel type of cytoplasmic granule in bovine neutrophils. *Journal of Cell Biology* 96:1651-1661.
- Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J (2003). *Immunology*. Freeman and Company, New York.
- Gonzalez L, Anderson I, Deane D, Summers C, Buxton D (2001). Detection of immune system cells in paraffin wax-embedded ovine tissues. *Journal of comparative Pathology* 125:41-47.
- Gonzalez-Rodriguez MC, Gonzalo C, San Primitivo F, Carmenes P (1995). Relationship between somatic cell count and intramammary infection of the half udder in dairy ewes. *Journal of Dairy Science* 78:2753–2759.

- Gougoulis DA, Kyriazakis I, Tzora A, Taitzoglou IA, Skoufos J, Fthenakis GC (2008). Effect of lamb sucking on the bacterial flora of teat duct and mammary gland of ewes. *Reproduction in domestic Animals* 43:22-26.
- Grindal RJ, Walton AW, Hillerton JE (1992). Influence of milk flow rate and streak canal length on new intramammary infection in dairy cows. *Journal of Dairy Research* 58:383-388.
- Guidry AJ, Miller RH (1986). Immunoglobulin isotype concentration in milk as affected by stage of lactation and parity. *Journal of Dairy Science* 69:1799-1805.
- Gunning RF, Bosworth PA (1989). Staphylococcal dermatitis involving the teats of lactating ewes. *The veterinary Record* 124:146-147.
- Hamann J (1987). Effects of machine milking on teat end condition-a literature review. *Bulletin of the International Dairy Federation* 215:33-53.
- Hamann J, Burvenich C (1994). Physiological status of the bovine teat. *Bulletin of the International Dairy Federation* 297:3-12.
- Hamann J, Duck M (1984). Erste Untersuchungsergebnisse zur Messung der Zitzenoberfläche unter Verwendung der Infrarot-Thermographie. *Die Milchpraxis* 22:148-152.
- Hamblin AS (1993). *Cytokines and Cytokine Receptors*. Oxford University Press, Oxford.
- Hampl A, Jelinek P (1971). The lymphatic capillaries in the skin of cow teat. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe A* 18:341-346.
- Harlan JM, Schwartz BR, Reidy MA, Schwartz SM, Ochs HD, Harker LA (1985). Activated neutrophils disrupt endothelial monolayer integrity by an oxygen radical-independent mechanism. *Laboratory Investigation* 52:141-150.
- Hatziminaoglou J, Zervas N, Hatziminaoglou P, Sinapis E (1984). Suitability of Karagouniko ewes (Greece) for machine milking. Preliminary findings on milk yield and composition, morphology, and the kinetics of milk ejection. *Proceedings of the 3rd International Congress on Mechanical Milking of Small Ruminants*, Valladolid, Spain, pp. 607-624.
- Heath TJ, Kerlin RL (1986). Lymph drainage from the mammary gland of ewes. *Journal of Anatomy* 144:61-70.
- Hein WR, Mackay CR (1991). Other surface antigens identified on sheep leukocyte. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 27:115-118.
- Henderson WR, Chi EY, Klebanoff SJ (1980). Eosinophil peroxidase-induced mast cell secretion. *Journal of experimental Medicine* 152:265-279.
- Hibbitt KG (1984). The structure and defence mechanisms of the bovine teat. *The veterinary Record* 115:170.

- Hibbitt KG, Cole CB, Reiter B (1969). Antimicrobial proteins isolated from the teat canal of the cow. *Journal of general Microbiology* 56:365.
- Hogan JS, Duthie AH, Pankey JW (1986). Fatty-acid composition of bovine teat canal keratin. *Journal of Dairy Science* 69:2424-2427.
- Hogan JS, Pankey JW, Duthie AH (1987). Growth inhibition of mastitis pathogens by long-chains fatty acids. *Journal of Dairy Science* 70:927-934.
- Hogan JS, Smith KL, Todhunter DA, Schoenberger PS (1988). Rate of environmental mastitis in quarters infected with *Corynebacterium bovis* and *Staphylococcus* species. *Journal of Dairy Science* 71:2520–2524.
- Hogeveen H, Miltenburg JD, den Hollander S, Frankena K (2001). Milking three times a day and its effect on udder health and production. *Mastitis Newsletter No. 24*, International Dairy Federation, Brussels.
- International Dairy Federation (2003). *Ruminant Mammary Gland Immunology*. International Dairy Federation, Brussels.
- Isenberg HD, D'Amato RF (1985). Indigenous and pathogenic microorganisms of humans. In: EH Lennette, H Balows, WJ Hausler Jr, HJ Shadomy HJ (eds). *Manual of Clinical Microbiology*, American Society for Microbiology, Washington, pp. 24-35.
- Jack RW, Tagg JR, Ray B (1995). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiology Reviews* 59:171-200.
- Jacques YV, Bainton DF (1978). Changes in pH within the phagocytic vacuoles of human neutrophils and monocytes. *Laboratory Investigation* 39:179-185.
- Jorstad A, Farver TB, Reimann H (1989). Teat canal diameter and other factors with possible influence on somatic cell counts in cow milk. *Acta Veterinaria scandinavica* 30:239-245.
- Kelm SC, Detilleux JC, Freeman AE, Kehrli Jr ME, Dietz AB, Fox LK, Butler JE, Kasckovics I, Kelley DH (1997). Genetic association between parameters of innate immunity and measures of mastitis in periparturient Holstein cattle. *Journal of Dairy Science* 80:1767-1775.
- Kraft R, Bachmann M, Bachmann K, Buerki H, Hess MW, Cottier H, Stoner RD (1987). Satisfactory primary tetanus antitoxin responses but markedly reduced germinal center formation in 1st draining lymph nodes of aging mice. *Clinical and experimental Immunology* 67:447-453.

- Lacy-Hulbert SJ, Hillerton JE (1995). Effect of physical properties of the teat canal on susceptibility to intramammary infection. *Proceedings of the 3rd IDF International Mastitis Seminar*, Tel Aviv, Israel, Session 1, pp. 19-24.
- Lam TJ, Schukken YH, van Vliet JH, Grommers FJ, Tielen MJ, Brand A (1997). Effect of natural infection with minor pathogens on susceptibility to natural infection with major pathogens in the bovine mammary gland. *American Journal of veterinary Research* 58:17–22.
- Lee CS, Lascelles AK (1969). Distribution of lymphatic vessels in mammary glands of ewes. *American Journal of Anatomy* 126:489-495.
- Lee CS, Outteridge PM (1981). Leucocytes of sheep colostrum, milk and involution secretion, with particular reference to ultrastructure and lymphocyte sub-populations. *Journal of Dairy Research* 48:225-237.
- Leitner G, Chaffer M, Caraso Y Ezra, Kababea D, Winkler M, Glickman A, Saran A (2003). Udder infection and milk somatic cell count, NAGase activity and milk composition-fat protein and lactose-in Israeli-Assaf and Awassi sheep. *Small Ruminant Research* 49:157-164.
- Leitner G, Chaffer M, Shamay A, Shapiro F, Merin U, Ezra E, Saran A, Silanikove N (2004). Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in sheep. *Journal of Dairy Science* 87:46-52.
- Lewis CJ (2000). Clostridial diseases. In: WB Martin, ID Aitken (eds) *Diseases of Sheep*, 3rd edn. Blackwell, Oxford, pp. 131-143.
- Leyshon WJ (1929). An examination of a number of cases of ovine mastitis. *Veterinary Journal* 85:286-300 & 331-344.
- Lina G, Boutite F, Tristan A, Bes M, Etienne J, Vandenesch F (2003). Bacterial competition for human nasal cavity colonization: role of staphylococcal agr alleles. *Applied and environmental Microbiology* 69:18-23.
- Linde K, Holmberg O, Astrom G (1980). The interference between coagulase negative staphylococci and *Corynebacterium bovis* and the common udder pathogens in the lactating cow. *Nordisk veterinær Medicin* 32:552-558.
- Linzell JL (1971). Mammary blood vessels, lymphatic and nerves. In: IR Falconer (ed.) *Lactation*. Butterworths, London, pp. 41-50.
- Lorenz RG, Chaplin DD, McDonald KG, McDonough JS, Newberry RD (2003). Isolated lymphoid follicle formation is inducible and dependent upon lymphotoxin-sufficient B

- lymphocytes, lymphotoxin β -receptor, and TNF receptor I function. *Journal of Immunology* 170:5475-5482.
- Lydyard PM, Rossi CE (2001). Cells, tissues and organs of the immune system. In: I Roitt, J Brostoff, D Male (eds) *Immunology*, 6th edn. Mosby, Philadelphia, pp. 15-44.
- McDonald JS (1973). Radiographic method for anatomic study of the teat canal: changes within the first lactation. *American Journal of veterinary Research* 34:169-171.
- McDonald JS (1975). Radiographic method for anatomic study of the teat canal: changes between milking periods. *American Journal of veterinary Research* 36:1241-1242.
- McNeilly TN, McClure SJ, Huntley JF (2008). Mucosal immunity in sheep and implications for mucosal vaccine development. *Small Ruminant Research* 76:83-91.
- McShane RD, Gallagher DS, Newkirk H, Taylor JF, Burzlaff JD, Davis SK, Skow LC (2001). Physical localization and order of genes in the class II region of the bovine MHC. *Animal Genetics* 32:235-239.
- Mackay CR, Maddox JF, Brandon MR (1987). Lymphocyte antigens of sheep: Identification and characterization using a panel of monoclonal antibodies. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 17:91-102.
- Margetin M, Capistrak A, Spanik J, Foltys V (1996). Somatic cells in sheep milk in relation to milk production and composition during sucking and milking. *Zivocisna Vyroba* 41:543-550.
- Martin WB (1996). Respiratory infections of sheep. *Comparative Immunology, Microbiology and infectious Diseases* 19:171-179.
- Martin G, Bergmann A (1991). Effect of targeted bacterial colonization of cattle udder on subsequent infection by pathogenic germs. *Monatschrif Veterinarmed* 46:770-773.
- Martinet L (1962). Embryology of the mammary gland of sheep. *Annales de Biologie animale, Biochimie et Biophysique* 2:175-184.
- Matthews KR, Harmon RJ, Smith BA (1990). Protective effect of *Staphylococcus chromogenes* infection against *S. aureus* infection in the lactating bovine mammary gland. *Journal of Dairy Science* 73:3457-3462.
- Mavrogianni VS, Cripps PJ, Brooks H, Taitzoglou IA, Fthenakis GC (2007). Presence of subepithelial lymphoid nodules in the teat of ewes. *Anatomia Histologia Embryologia* 36:168-171.
- Mavrogianni VS, Cripps PJ, Fthenakis GC (2006). Description and validation of a novel technique to study the bacterial flora of the teat duct of ewes. *Small Ruminant Research* 66: 258-264.

- Mavrogianni VS, Cripps PJ, Fthenakis GC (2007). Bacterial flora and risk of infection of the ovine teat duct and mammary gland throughout lactation. *Preventive veterinary Medicine* 79:163-173.
- Mavrogianni VS, Cripps PJ, Papaioannou N, Taitzoglou I, Fthenakis GC (2006). Teat disorders predispose ewes to clinical mastitis after challenge with *Mannheimia haemolytica*. *Veterinary Research* 37:89-105.
- Mavrogianni VS, Fthenakis GC (2007). Clinical, bacteriological, cytological and pathological features of teat disorders in ewes. *Journal of veterinary Medicine A* 54:219-223.
- Mavrogianni VS, Fthenakis GC, Brooks H, Papaioannou N, Cripps PJ, Taitzoglou I, Brellou G, Saratsis P (2005). The effects of inoculation of *Mannheimia haemolytica* into the teat of lactating ewes. *Veterinary Research* 36:13-25.
- Mavrogianni VS, Fthenakis GC, Burriel AR, Gouletsou P, Papaioannou N, Taitzoglou IA (2004). Experimentally induced teat stenosis in dairy ewes: clinical, pathological and ultrasonographic features. *Journal of comparative Pathology* 13:70-74.
- May NDS (1970). *The Anatomy of the Sheep*. University of Queensland Press, Melbourne.
- Mayrand D, Grenier D (1998). Bacterial interactions in periodontal disease. *Bulletin de l' Institut Pasteur* 96:125-133.
- Melchior MB, Vaarkamp H, Fink-Gremmels J (2006). Biofilms: a role in recurrent mastitis infection. *Veterinary Journal* 171:398-407.
- Menzies PI, Ramanoon SZ (2001). Mastitis of sheep and goats. *The veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* 17:333-357.
- Miles AA, Misra SS (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *Journal of Hygiene (Cambridge)* 38:732-749.
- Mitchell RN, Cotran RS (1997). Acute and Chronic Inflammation. In: V Kumar, RS Cotran, RL Stanley (eds) *Basic Pathology*, 6th edn. Saunders, Philadelphia, pp. 25-46.
- Moll R, Franke WW, Volc-Platzer B, Krepler R (1982). Different keratin polypeptides in epidermis and other epithelia of human skin: a specific cytokeratin of molecular weight 46,000 in epithelia of the pilosebaceous tract and basal cell epitheliomas. *Journal of cellular Biology* 95:285-295.
- Monteiro-Riviere NA, Stinson AW, Calhoun HL (1993). Integument. In: HD Dellmann (ed.) *Textbook of Veterinary Histology*, 4th edn. Lea & Febiger, Philadelphia, pp. 285-288.
- Moyron-Quiroz JE, Rangel-Moreno J, Kusser K, Hartson L, Sprague F, Goodrich S, Woodland DL, Lund FE, Randall TD (2004). Role of inducible bronchus associated lymphoid tissue (iBALT) in respiratory immunity. *Nature Medicine* 10:927-934.

- Mulder K, Colditz IG (1993). Migratory responses of ovine neutrophils to inflammatory mediators in vitro and in vivo. *Journal of Leukocyte Biology* 53:273-278.
- Murakami J, Shimizu Y, Kashi Y, Kato T, Minemura M, Okada K, Nambu S, Takahara T, Higuchi K, Maeda Y, Kumada T, Watanabe A (1999). Functional B-cell response in intrahepatic lymphoid follicles in chronic hepatitis C. *Hepatology* 30:143-150.
- Murdough PA, Martus NS, Mazzola GJ, Salamun DM, Scudder PJ, Urbano MA, Pankey JW (1991). In vitro growth of mastitis pathogens on teat canal keratin. *Journal of Dairy Science* 74(Suppl. 1): 204.
- Murphy JM (1959). The effect of certain milk stresses to the bovine teat canal on infection with *Streptococcus agalactiae*. *Cornell Veterinarian* 49:411-420.
- Neijenhuis F, Barkema HW, Hogeveen H, Noordhuizen JPTM (2001). Relationship between teat-end callosity and occurrence of clinical mastitis. *Journal of Dairy Science* 84:2664-2672.
- Newberry RD, Lorenz RG (2005). Organizing a mucosal defense. *Immunology Reviews* 206:6-21.
- Nickerson SC (1987). Resistance mechanisms of the bovine udder: new implications for mastitis at the teat end. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 191:1484-1488.
- Noble WC, Somerville DA (1974). Skin as a habitat. In: WC Noble (ed.) *Microbiology of Human Skin*. Saunders, Philadelphia, pp. 3-78.
- Norcross NL (1991). Specific defence mechanisms of the udder. *Flemish veterinary Journal* 62(Suppl. 1):129-139.
- Olechnowicz J, Jaskowski JJM (2005). Somatic cells in sheep milk. *Medycyna Weterynaryjna* 61:136-141.
- Onash H, Healy AM, Brophy PO, Kinsella A, Doherty ML (2003). A study of mastitis in sheep, *Proceedings of Meetings of the Sheep Veterinary Society* 27:49-50.
- O'Shea J, O'Callaghan E, Meaney S (1987). Liner slip and impacts. *Proceedings of the International Mastitis Symposium*, Guelph, Canada, pp. 44-65.
- Outteridge PM, Lee CS (1981). Cellular immunity in the mammary gland with particular reference to T, B lymphocytes and macrophages. *Advances in experimental Medicine and Biology* 137:513-534.
- Paape MJ, Miller RH, Ziv G (1991). Pharmacologic enhancement or suppression of phagocytosis by bovine neutrophils. *American Journal of veterinary Research* 52:363-366.

- Paape MJ, Schultze WD, Guidry AJ (1985). Development of natural defense mechanisms. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* 37:447-457.
- Paape MJ, Wiggans GR, Bannerman DD, Thomas DL, Sanders AH, Contreras A, Moroni P, Miller RH (2007). Monitoring goat and sheep milk somatic cell counts. *Small Ruminant Research* 68: 114–125.
- Pankey JW, Murdough PA, Wood DL, Capuco AV, Bitman J (1995). A model for mastitis growth studies on teat canal keratin. In: *Proceedings of the 3rd IDF International Mastitis Seminar*, Tel Aviv, Israel, Session 2, pp. 42-46.
- Paulrud CO (2005). Basic concepts of the bovine teat canal. *Veterinary Research Communications* 29:215-245.
- Paulrud CO, Rasmussen MD (2004). How teat canal keratin depends on the length and diameter of the teat canal in dairy cows. *Journal of Dairy Research* 71:253-255.
- Peeters G, Coussens R, Sierens G (1949). Physiology of the nerves in the bovine mammary gland. *Archives of international Pharmacodynamics and Therapeutics* 79:75-82.
- Persson K (1991). Microcirculation in the bovine teat skin, measured by laser-doppler flowmetry. *Acta Veterinaria scandinavica* 32:131-133.
- Persson K (1992). *Studies on Inflammation in the Bovine Teat*. Ph.D. thesis, Swedish University of Agricultural Sciences.
- Persson K, Colditz IG, Flapper P, Franklin NAF, Seow HF (1996). Cytokine-induced inflammation in the ovine teat and udder. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 53:73-85.
- Persson K, Larsson I, Sandgren CH (1993). Effects of certain inflammatory mediators on bovine neutrophil migration in vivo and in vitro. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 37:99-112.
- Persson-Waller K, Colditz IG, Seow HF (1997). Accumulation of leucocytes and cytokines in the lactating ovine udder during mastitis due to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Research in veterinary Science* 62:63-66.
- Plommet M (1960). Staphylococcal mastitis in sheep. Experimental infection. *Annales de l'Institut Pasteur de Paris* 98:439-455.
- Purdy CW, Cooley JD, Straus DC (1998). Cross-protection studies with three serotypes of *Pasteurella haemolytica* in the goat model. *Current Microbiology* 36:207-211.
- Pyorala S (2003). Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Veterinary Research* 34:565-578.

- Quinney S, Davison N, Bebbington T (2003). Severe teat lesions in a sheep flock. *The veterinary Record* 152:696.
- Raab WP (1990). The skin surface and stratum corneum. *British Journal of Dermatology* 122(Suppl. 35):37-41.
- Rainard P (2003). The complement in milk and defense of the bovine mammary gland against infections. *Veterinary Research* 34:647-670.
- Rainard P, Poutrel B (1988). Effect of naturally occurring intramammary infections by minor pathogens on new infections by major pathogens in cattle. *American Journal of veterinary Research* 49:327-329.
- Ramney RR (1991). Immunologic mechanisms of pathogenesis in periodontal diseases: an assessment. *Journal of periodontal Research* 26:243-254.
- Rathore AK (1976). Relationships between teat shape, production and mastitis in Friesian cows. *British veterinary Journal* 132:389.
- Rathore AK (1977). Teat shape and production associated with opening and prolapse of the teat orifice in Friesian cows. *British veterinary Journal* 133:258-261.
- Raynaud A (1971). Foetal development of the mammary gland and hormonal effects on its morphogenesis. In: IR Falconer (ed.) *Lactation*. Butterworths, London, pp. 3-29.
- Reif MH, Field T, Diego M (2001). Differential sucking by neonates of depressed versus non-depressed mothers. *Infant Behaviour and Development* 27:465-476.
- Roger PA (2008). The impact of disease and disease prevention on sheep welfare. *Small Ruminant Research* 76:104-111.
- Saini SS, Allore B, Jacobs RM, Kaushik AT (1999). Exceptionally long CDR3H region with multiple cysteine residues in functional bovine IgM antibodies. *European Journal of Immunology* 29:2420-2426.
- Saloniemi H, Roine K (1981). Field observations on the incidence of bovine clinical mastitis and teat diseases. *World Veterinarian* 43:297-305.
- Santos RA, Mendonca CL, Alfonso JAB, Simao LCV (2007). Clinical aspects and characteristics of the milk in sheep with mastitis experimentally induced with *Staphylococcus aureus*. *Pesquisa veterinaria brasileira* 27:6-12.
- Saratsis P, Alexopoulos C, Tzora A, Fthenakis GC (1999). The effect of experimentally induced subclinical mastitis on the milk yield of dairy ewes. *Small Ruminant Research* 32:205-209.
- Schalm OW, Carrol EJ, Jain NC (1971). *Bovine Mastitis*. Lea & Febiger, Philadelphia.

- Schijins VECJ, Horzinek MC (1997). *Cytokines in Veterinary Medicine*. CAB International, Oxford.
- Schulz von J, Michel G, Seffner W (1974). Zur Abwehrfunktion der Zitze des Rindes. *Monatshefte für Veterinärmedizin* 29:662-667.
- Schulze WD, Bright SC (1983). Changes in penetrability of bovine papillary duct to endotoxin after milking. *American Journal of veterinary Research* 44: 2373-2375.
- Schummer A, Wilkens H, Vollmerhaus B, Habermehl KH (1981). The circulatory system, the skin and the cutaneous organs of the domestic mammals. In: R Nickel, A Shummer, E Seiferle (eds). *The Anatomy of the Domestic Animals*. Paul Paney, Berlin, vol. 3, pp. 468-524.
- Schwerin W, Solinas-Toldo S, Eggen A, Bruner R, Seyfert HM, Fries R (1994). The bovine lactoferrin gene (LTF) maps to chromosome 22 and syntenic group U12. *Mammalian Genome* 5:486-489.
- Senft B, Meyer F, Hartmann ML (1980). The importance of proteins of teat canal keratin as complex defense system of bovine mammary gland. *Milchwissenschaft* 45:295-298.
- Shuster DE, Kehrli Jr ME, Rainard P, Paape M (1997). Complement fragment C5a and inflammatory cytokines in neutrophils recruitment during intramammary infection with *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 65:3286-3292.
- Sieber RL, Farnsworth RJ (1984). Differential diagnosis of bovine teat lesions. *Veterinary Clinics of North America - Large Animal Practice* 6:313-321.
- Sinapis E (2007). The effect of machine or hand milking on milk production, composition and SCC in mountainous Greek breed (Boutsiko) ewes. *Small Ruminant Research* 69:242-246.
- Sladek Z, Rysanek D (2001). Neutrophil apoptosis during the resolution of bovine mammary gland injury. *Research in veterinary Science* 70:41-46.
- Skoufos J, Mavrogianni VS, Tzora A, Mavrommatis I, Alexopoulos C, Fthenakis GC (2006). Use of lincomycin to control respiratory infections in lambs: effects on health and production. *Small Ruminant Research* 66:214-221.
- Slee J, Springbett A (1986). Early post-natal behaviour in lambs of ten breeds. *Applied Animal Behaviour Science* 15:229-240.
- Smith H (1995). The revival of interest in mechanisms of bacterial pathogenicity. *Biological Reviews* 70: 277–316.
- Sordillo LM, Nickerson SC, Akers RM, Oliver SP (1987). Secretions composition during bovine mammary involution and the relationship with mastitis. *International Journal of Biochemistry* 19:1165-1172.

- Sordillo LM, Streicher KL (2002). Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Journal of mammary Gland Biology* 7:135-146.
- Stefanakis A, Boscors C, Alexopoulos C, Samartzi F (1995). Frequency of subclinical mastitis and observations on somatic cell counts in ewes' milk in Northern Greece. *Animal Science* 61:69-76.
- Straus DC, Purdy CW (1994). In-vivo production of neuraminidase by *Pasteurella haemolytica* A1 in goats after transthoracic challenge. *Infection and Immunity* 62:4675-4678.
- Swensson O, Langbein L, McMillan JR, Stevens HP, Leigh IM, McLean WHI, Lane EB, Eady RAJ (1998). Specialized keratin expression pattern in human rigid skin as an adaptation to high physical stress. *British Journal of Dermatology* 139:767-775.
- Swiderek WP, Charon KM, Winnicka A, Gruszczynska J (2006). Relationship between blood lymphocyte phenotype, DRB1 (MHC class II) gene polymorphism and somatic cell count in ewe milk. *Bulletin of the veterinary Institute in Pulawy* 50:73-77.
- Tagand R (1932). Anatomy of the mammary vessels. *Lait* XII:881-893.
- Takeshima SN, Aida Y (2006). Structure, function and disease susceptibility of the bovine major histocompatibility complex. *Animal Science Journal* 77:138-150.
- Tizard IR (2004). *Veterinary Immunology. An Introduction*, 7th edn. Saunders, Philadelphia.
- Tsuno H, Hidaka T, Nishimura F (2002). A simple biofilm model of bacterial competition for attached surface. *Water Research* 36:996-1006.
- Turner CN (1952). *The Anatomy of the Udder of Cattle and Domestic Animals*. Lucas Brothers, Columbia.
- Uppal SK, Singh KB, Nauriyal DC, Bansal K (1994). Natural defence mechanisms against mastitis: a comparative histomorphology of buffalo and cow teat canal. *Buffalo Journal* 2:125-131.
- Van Rensburg E, Du Preez JC, Ellis CE (2006). Quantification of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin by indirect ELISA. *Onderstepoort Journal of veterinary Research* 73:241-250.
- Vilela CL, Fitzpatrick J, Morgan KL (2004). In vitro adherence and invasion of ovine mammary epithelium by *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica*. *Veterinary Journal* 167:211-213.
- Watkins GH (1990). *Field and Experimental Investigations of Ovine Mastitis caused by Pasteurella haemolytica*. Ph.D. thesis, The Royal Veterinary College, University of London.

- Watkins GH, Burriel AR, Jones JET (1991). A field investigation of subclinical mastitis in sheep in southern England. *British veterinary Journal* 147:413-420.
- Watkins GH, Jones JET (1992). The effect of intra-mammary inoculation of lactating ewes with *Pasteurella haemolytica* isolates from different sources. *Journal of comparative Pathology* 106:9-14.
- Watson DL, Franklin NA, Davies HI, Kettlewell P, Frost AJ (1990). Survey of intramammary infections in ewes on the New England Tableland of New South Wales. *Australian veterinary Journal* 67:6-8.
- Williams DMD (1984). *A Study of the Epithelium of the Bovine Teat Canal*. Ph.D. thesis, University of Melbourne.
- Williams DMD, Mein GA (1985). The role of machine milking in the invasion of mastitis organisms and implication for maintaining low infection rates. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* 47:415-425.
- Winter P, Colditz IG (2002). Immunological responses of the lactating ovine udder following experimental challenge with *Staphylococcus epidermidis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 89:57-65.
- Witzig P, Rusch P, Berchtold M (1984). Characteristics, diagnosis and treatment of ruptured mucous membranes in the teat canal of cows. *Deutsche tierärztliche Wochenschrift* 91:219-222.
- Zecchinon L, Fett T, Desmecht D (2005). How *Mannheimia haemolytica* defeats host defence through a kiss of death mechanism. *Veterinary Research* 36:133-156.
- Zygoiannis D (2006). Sheep production in the world and in Greece. *Small Ruminant Research* 62:143-147.