

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΘΗΛΑΣΜΟΥ ΑΡΝΙΩΝ ΚΑΙ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΙΚΟΥ ΑΔΕΝΑ ΣΕ ΠΡΟΒΑΤΙΝΕΣ

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Α. ΓΚΟΥΓΚΟΥΛΗΣ

Κτηνίατρος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

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

Καρδίτσα 2007

A candle loses nothing by lighting another candle

Erin Majors

ΑΦΙΕΡΩΝΕΤΑΙ

ΣΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΟΝ ΑΔΕΛΦΟ ΜΟΥ

Χωρίς αυτούς, τίποτα δε θα ήταν δυνατό

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διατριβή εστιάζεται στη μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ της συμπεριφοράς του θηλασμού και της υγείας του μαστικού αδένος στα πρόβατα. Η διατριβή χωρίζεται σε τέσσερα κεφάλαια και ακολουθεί η Γενική Συζήτηση.

Στο Κεφάλαιο I ανασκοπείται η σχετική βιβλιογραφία. Το Κεφάλαιο υποδιαιρείται σε πέντε τμήματα.

Στο Κεφάλαιο II, μετά από σύντομη εισαγωγή (τμήμα Α), περιγράφονται τα φυσιολογικά πρότυπα μητρικής συμπεριφοράς και συμπεριφοράς θηλασμού των προβάτων Καραγκούνικης φυλής (τμήμα Β).

Πραγματοποιήθηκε ένας πειραματισμός, για τη διερεύνηση της συμπεριφοράς των προβατίνων και των αρνιών τους κατά τη διάρκεια της περιόδου θηλασμού, σε σχέση με την υγεία των μαστικών αδένων των θηλυκών ζώων. Για το σκοπό αυτό, συλλέχθηκαν δείγματα υλικού θηλαίου πόρου και γάλακτος για μικροβιολογική και κυτταρολογική εξέταση από 12 προβατίνες (6 με ένα αρνί και 6 με δύο αρνιά). Επιπλέον, έγινε καταγραφή της συμπεριφοράς των ζώων. Ο πειραματισμός διήρκεσε 42 ημέρες μετά τον τοκετό. Βακτήρια απομονώθηκαν από 8,1% ή 0,6% αντίστοιχα, των 480 δειγμάτων υλικού θηλαίου πόρου ή γάλακτος. Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στη συχνότητα απομόνωσης βακτηρίων μεταξύ προβατίνων με ένα ή δύο αρνιά ($P=0,637$). Όμως, η συχνότητα απομόνωσης βακτηρίων στο 1ο στάδιο (D0-D3 μετά τον τοκετό): 0,125, ήταν μεγαλύτερη από αυτή στο 2ο (D4-D11): 0,083, στο 3ο (D12-D30): 0,063 ή στο 4ο (D31-D42): 0,069 στάδιο ($P<0,001$) της περιόδου πειραματισμού. Σε γενικές γραμμές, οι προβατίνες εκδήλωσαν πρότυπα συμπεριφοράς παρόμοια με αυτά που έχουν περιγραφεί σε προβατίνες κρεοπαραγωγικών φυλών. Όμως, αφενός δεν καταγράφηκε καμία αρνητική μητρική συμπεριφορά και αφετέρου οι συμπεριφορές "Περιποίηση νεογέννητου" και "Όσφρηση / Επαφή με τη μύτη" εκδηλώθηκαν με μικρότερη συχνότητα και ένταση απ' ό,τι αναφέρεται στη βιβλιογραφία για κρεοπαραγωγικές φυλές προβάτων. Επιπλέον, καταγράφηκε προοδευτική αύξηση της συχνότητας των συμπεριφορών "Παρεμπόδιση θηλασμού" και "Όρθια στάση με έκταση της κεφαλής" ($P=0,038$ και $P<0,001$, αντίστοιχα) στις προβατίνες κατά τη διάρκεια της περιόδου θηλασμού. Όσον αφορά στα αρνιά, κατά τη διάρκεια του θηλασμού καταγράφηκε προοδευτική μείωση της διάρκειας των συμπεριφορών "Προσπάθεια θηλασμού" και "Επιτυχής θηλασμός" ($P<0,05$). Επιπλέον, παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ μονόδυμων και δίδυμων αρνιών στη συχνότητα και τη διάρκεια της συμπεριφοράς "Προσπάθεια θηλασμού"

($P < 0,001$). Ειδικά στα δίδυμα αρνιά, η συχνότητα της συμπεριφοράς "Ταυτόχρονος θηλασμός" προοδευτικά αυξήθηκε.

Στο Κεφάλαιο III, ύστερα από σύντομη εισαγωγή (τμήμα A), παρουσιάζεται η επίδραση του θηλασμού στη μετάδοση βακτηρίων στη θηλή των προβατίνων (τμήμα B).

Πραγματοποιήθηκε ένας πειραματισμός, για την εκτίμηση των διαφορών στους βακτηριακούς πληθυσμούς στο θηλαίο πόρο και το μαστικό αδένων των προβατίνων πριν και μετά το θηλασμό και για την αξιολόγηση παραγόντων που πιθανόν επηρεάζουν αυτές τις διαφορές. Για το σκοπό αυτό, συλλέχθηκαν δείγματα υλικού θηλαίου πόρου και γάλακτος για μικροβιολογική και κυτταρολογική εξέταση από 11 προβατίνες (7 με ένα αρνί και 4 με δύο αρνιά) αμέσως πριν και αμέσως μετά το θηλασμό, καθώς και 120 min αργότερα. Ο πειραματισμός διήρκεσε για περίοδο 6 εβδομάδων μετά τον τοκετό. Τα ευρήματα της βακτηριολογικής εξέτασης στο υλικό θηλαίου πόρου και στο γάλα μετά το θηλασμό συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα ευρήματα πριν από αυτόν χρησιμοποιώντας τη δοκιμή Sign. Πριν το θηλασμό, βακτήρια απομονώθηκαν από 3,5% ή 1,5% αντίστοιχα, των 396 δειγμάτων υλικού θηλαίου πόρου ή γάλακτος. Μετά το θηλασμό, απομονώθηκαν βακτήρια από 10,6% ή 2,0% των δειγμάτων αντίστοιχα, ενώ 120 min αργότερα από 6,8% ή 1,5% των δειγμάτων αντίστοιχα. Σε 40 περιπτώσεις, τα βακτηριολογικά ευρήματα στο υλικό θηλαίου πόρου ήταν διαφορετικά σε καθένα από τα δύο δείγματα κάθε ζεύγους: σε 6 περιπτώσεις απομονώθηκαν βακτήρια μόνον πριν το θηλασμό και σε 34 περιπτώσεις μόνο μετά από αυτόν ($P < 0,001$). Τα αντίστοιχα αποτελέσματα για το γάλα ήταν 4: 1 και 3 περιπτώσεις. Παρατηρήθηκαν επίσης διαφορές μεταξύ των δειγμάτων υλικού θηλαίου πόρου αμέσως μετά το θηλασμό και 120 min αργότερα, σε 12 περιπτώσεις: σε 8 περιπτώσεις απομονώθηκαν βακτήρια μόνο μετά το θηλασμό και σε 4 περιπτώσεις μόνον 120 min αργότερα ($P = 0,375$). Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ προβατίνων με ένα ή δύο αρνιά ($P > 0,3$), ούτε μεταξύ των σταδίων της περιόδου θηλασμού ($P > 0,4$). Η πλειονότητα των απομονωθέντων βακτηρίων, ήταν Σταφυλόκοκκοι και αποτελούσαν 70% των στελεχών που απομονώθηκαν πριν το θηλασμό, 80% των στελεχών που απομονώθηκαν μετά από αυτόν και 91% των στελεχών που απομονώθηκαν 120 min αργότερα. Επιπλέον, σε δύο περιπτώσεις απομονώθηκε *Mannheimia haemolytica* από δείγματα υλικού θηλαίου πόρου αμέσως μετά το θηλασμό.

Στο Κεφάλαιο IV, ύστερα από σύντομη εισαγωγή (τμήμα A), παρουσιάζονται οι επιπτώσεις της υποκλινικής μαστίτιδας στη συμπεριφορά θηλασμού των προβάτων (τμήμα B). Πραγματοποιήθηκε ένας πειραματισμός για τη διερεύνηση της συμπεριφοράς των προβατίνων και των αρνιών τους, μετά από πρόκληση υποκλινικής μαστίτιδας. Για το σκοπό αυτό, προκλήθηκε υποκλινική μαστίτιδα σε 8 προβατίνες (όλες με ένα αρνί) μετά από ενοφθαλμισμό ενός μαστικού αδένου τους με ένα παθογόνο στέλεχος *Staphylococcus simulans*. Επιπλέον,

χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες 4 προβατίνες με υγιείς μαστικούς αδένες. Στη συνέχεια, συλλέχθηκαν δείγματα μαστικού εκκρίματος για μικροβιολογική και κυτταρολογική εξέταση και μετρήθηκε η παραγωγή γάλακτος των προβατίνων και το βάρος των αρνιών. Επιπλέον, έγινε καταγραφή της συμπεριφοράς των ζώων. Προοδευτικά παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της συχνότητας των συμπεριφορών "Προσπάθεια θηλασμού" και "Επιτυχής θηλασμός" στα αρνιά και των δύο ομάδων. Όμως τα αρνιά των προβατίνων με ενοφθαλισμένους μαστικούς αδένες εκδήλωσαν τις συμπεριφορές αυτές με μεγαλύτερη συχνότητα και διάρκεια στους υγιείς παρά στους ενοφθαλισμένους μαστικούς αδένες ($P < 0,05$). Αντίθετα, ανάλογη συμπεριφορά δεν παρατηρήθηκε στα αρνιά των υγιών προβατίνων.

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

(α) Παρατηρήθηκαν κάποιες διαφορές στα πρότυπα συμπεριφοράς θηλασμού των ζώων μίας φυλής προβάτων γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης, από αυτά που αναφέρονται στη βιβλιογραφία για πρόβατα κρεοπαραγωγικών φυλών. Οι προβατίνες γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης δεν μπορούν να χαρακτηριστούν ως "κακές" μητέρες. Οι προβατίνες γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης αφιέρωναν μειωμένο χρόνο περιποίησης στα νεογέννητα αρνιά αμέσως μετά τον τοκετό. Αυτό πιθανόν συμβάλλει στη μειωμένη συχνότητα των αναπνευστικών συνδρόμων στις εκτροφές προβάτων. Οι προβατίνες επιδιώκουν τον τερματισμό ενός "Επεισοδίου θηλασμού" όταν ο μαστικός αδένας κενώνεται. Έτσι αποφεύγεται ο τραυματισμός της θηλής και συνακόλουθα η εκδήλωση μαστίτιδας. Η αυξημένη συχνότητα και διάρκεια των επεισοδίων θηλασμού στην αρχή της γαλακτικής περιόδου, πιθανόν οδηγεί σε αυξημένη συχνότητα απομόνωσης βακτηρίων από το μαστικό αδένια των προβατίνων. Προβατίνες με επαρκή παραγωγή γάλακτος μπορούν να αρμέγονται ακόμη και πριν την απομάκρυνση των αρνιών τους. Ο θηλασμός από δίδυμα αρνιά δε φαίνεται ότι προκαλεί αυξημένη συχνότητα μόλυνσης της θηλής και του μαστικού αδένια.

(β) Κατά τη διάρκεια του θηλασμού μεταδίδονται βακτήρια από τα αρνιά στις προβατίνες. Ο θηλασμός αυξάνει την πιθανότητα μόλυνσης του θηλαίου πόρου. Συγκεκριμένα, μεταδίδονται *M. haemolytica* και Σταφυλόκοκκοι από τη στοματική κοιλότητα των αρνιών στις θηλές των προβατίνων. Ωστόσο, οι υγιείς θηλές μπορούν να αποτρέψουν τη μόλυνση του σύστοιχου μαστικού αδένια.

(γ) Η υποκλινική μαστίτιδα οδηγεί σε μεταβολή της συμπεριφοράς θηλασμού των αρνιών. Εξαιτίας της μείωσης της παραγωγής γάλακτος μεταβάλλεται η συμπεριφορά των αρνιών, που θηλάζουν συχνότερα τον υγιή αδένια. Σε περιπτώσεις μονόδυμων αρνιών, η αύξηση του βάρους τους δεν επηρεάζεται.

(δ) Συνιστάται η αξιολόγηση της υγείας του μαστικού αδένου σε κάθε μελέτη συμπεριφοράς θηλασμού σε πρόβατα. Έτσι θα αποφεύγονται πιθανά λάθη και αντικρουόμενα αποτελέσματα σε διαφορετικές μελέτες.

Δημοσιεύσεις σχετιζόμενες με την παρούσα διατριβή

Στις παρακάτω επιστημονικές δημοσιεύσεις παρουσιάζονται τμήματα της παρούσας διατριβής:

I. Δ.Α. Γκουγκουλής, Η. Κυριαζάκης, Γ.Χ. Φθενάκης (2007) "Πρότυπα μητρικής συμπεριφοράς προβατίνων και συμπεριφοράς θηλασμού αρνιών" *Περιοδικό της ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρείας*, δεκτό για δημοσίευση.

II. D.A. Gougoulis, I. Kyriazakis, A. Tzora, I.A. Taitzoglou, J. Skoufos, G.C. Fthenakis (2007). "Effects of lamb sucking on the bacterial flora of teat duct and mammary gland of ewes" *Reproduction in domestic Animals*, δεκτό για δημοσίευση.

III. D.A. Gougoulis, I. Kyriazakis, N. Papaioannou, E. Papadopoulos, I.A. Taitzoglou, G.C. Fthenakis (2008) "Effects of subclinical mastitis on patterns of maternal - offspring behaviour of dairy sheep" *The veterinary Journal*, δεκτό για δημοσίευση.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Γ.Χ. Φθενάκης, Αναπληρωτής καθηγητής	Επιβλέπων
Κλινική Μαιευτικής και Αναπαραγωγής, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας	
Η. Κυριαζάκης, Καθηγητής	Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής
Εργαστήριο Ζωοτεχνίας και Διατροφής, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας	
Ι. Ταϊτζόγλου, Αναπληρωτής καθηγητής	Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής
Εργαστήριο Φυσιολογίας, Κτηνιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης	

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ν. Κοκόλης, Καθηγητής	Κτηνιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
Η. Κυριαζάκης, Καθηγητής	Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Κ. Μπόσκος, Καθηγητής	Κτηνιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
Ν. Παπαϊωάννου, Αναπληρωτής καθηγητής	Κτηνιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
Ι.Α. Ταϊτζόγλου, Αναπληρωτής καθηγητής	Κτηνιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
Γ.Χ. Φθενάκης, Αναπληρωτής καθηγητής	Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Γ.Σ. Αμοιρίδης, Επίκουρος καθηγητής	Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

**INTERACTIONS BETWEEN SUCKING
BEHAVIOUR OF LAMBS AND INFECTION
OF THE MAMMARY GLAND OF EWES**

DIMITRIS A. GOUGOULIS

DVM (Thessaloniki)

**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 2007

ABSTRACT

The general objective of the present thesis was the study of potential associations and interactions between ovine mastitis and sucking behaviour of lambs.

The thesis is divided into four chapters followed by the General Discussion.

In the first Chapter, the relevant literature is reviewed. The Chapter is subdivided into five Parts.

In the second Chapter, after a brief introduction (Part A), the patterns of sucking behaviour in a dairy sheep breed are presented (Part B).

An experiment was carried out, where lactational behaviour in Karagouniko-breed sheep and potential associations with mammary health were investigated. Behavioural recordings were made and teat duct and mammary secretion samples were collected for bacteriological and cytological examinations, in 12 ewes (6 with single lambs and 6 with twins) for 42 days after lambing. Ewes performed similar patterns of behaviour as described for meat-breeds, but with some differences. No negative maternal behaviours were observed; furthermore, ewes showed reduced "Grooming" and "Sniffing" immediately post-partum. Of 480 duct or secretion samples, 39 and 3, respectively, yielded bacteria. There was no difference in frequency of bacterial isolation from ewes sucking singles or twins: 46% and 54% of isolates, respectively ($P=0.637$); there was greater frequency of bacterial isolation during 1st stage of lactation (D0-D3): 0.125, vs 2nd (D4-D11): 0.083, 3rd (D12-D30): 0.063 or 4th (D31-D42): 0.069 ($P<0.001$) and of positive California Mastitis Test scores during 1st stage of lactation: 0.917, vs 2nd: 0.550, 3rd: 0.140 or 4th: 0.181 ($P<0.001$). There was decreasing duration of "Sucking attempt" and "Successful suck" throughout lactation ($P<0.05$). There was increasing frequency of "Hindering sucking" and of "Head up posture" from 1st to subsequent stages of lactation ($P=0.038$ and $P<0.001$), whilst "Hindering sucking" coincided with end of "Sucking bouts" of lambs.

In the third Chapter, after a brief introduction (Part A), the possibility of bacterial transmission of bacteria to the teat of ewes has been studied (Part B).

An experiment, aimed i) to determine differences in bacterial populations of teat duct and mammary gland of ewes before and after suckling and ii) to evaluate factors potentially affecting them, has been carried out. Samples of teat duct material and mammary secretion from 11 ewes have been carried out immediately before and after sucking by lambs, as well as 120 min later. Samples were processed bacteriologically and changes in infection have been compared

by the Sign Test. Bacteria were isolated from 3.5% duct and 1.5% secretion samples before suckling; respective figures post suckling were 10.6% and 2.0% and 120 min later 6.8% and 1.5%. Differences were recorded in infection of duct samples before and after suckling in 40 cases; bacteria were isolated before suckling from 6 samples, whereas after it from 34 ($P<0.001$). Differences were also recorded in samples collected after suckling and 120 min later in 12 cases; bacteria were isolated immediately post suckling from 8 samples, whereas 120 min later from 4 ($P=0.375$). No significant changes were seen for secretion. Neither differences between ewes with single or twin lambs, nor among stages of lactation were evident. Bacteria isolated were mostly staphylococci: 70% of isolates before suckling, 80% of isolates after it, 91% of isolates 120 min later. After suckling, two *Mannheimia haemolytica* strains were also isolated from teat duct samples.

In the fourth Chapter, after a brief introduction (Part A), the possible adverse effects of subclinical mastitis to the sucking behaviour of lambs have been assessed (Part B).

An experiment was carried out, where subclinical mastitis was induced by inoculating one mammary gland of ewes ($n=8$) with a *Staphylococcus simulans* isolate; control ewes ($n=4$) were also included. After inoculation, the California Mastitis Test reaction score of mammary secretion increased and the organism was recovered from the secretion; milk yield of inoculated glands decreased ($P<0.001$). Throughout the study, there was a significantly increased frequency of "Hindering sucking" ($P=0.045$) and "Head up posture" ($P=0.003$) in control ewes; conversely, there was significantly increased frequency of "Vocalisation" ($P=0.013$) in infected ewes. There was a significant difference in frequency of "Sucking attempt" and "Successful suck" ($P<0.05$) behaviours between lambs of the two groups. Lambs of challenged ewes showed a significantly increased frequency and duration of the two behaviours to uninoculated glands of their dams, rather than to challenged glands ($P<0.05$); no such difference was evident for lambs of control ewes.

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

(a) We observed some differences in patterns of lactational behaviour in sheep of a dairy breed compared to those described in the international literature for meat-breeds. Dairy ewes cannot be considered as poor mothers. Reduced attention to lambs during neonatal life may contribute to smaller incidence of respiratory disorders observed in Greek flocks. Termination of sucking activity by the ewe when her mammary glands have been emptied, prevents damage to teat and likely development of mastitis. More frequent and longer sucking events of lambs during early lactation, may contribute to increased bacterial recoveries from mammary glands of ewes. The

results corroborate the suggestion for milking of ewes, even before weaning of lambs. Twins lambs were not associated with an increased infection rate of teat ducts and mammary glands of their dams.

(b) The results show that bacteria can be transmitted from lambs to the teats of ewes during sucking activity. This increases the risk of infection of the teat duct of ewes. Nevertheless, teats are able to withstand and minimize the infection within the next two hours. The results also show that *M. haemolytica* and Staphylococci are the principal organisms transmitted during sucking activity.

(c) Subclinical mastitis changes the patterns of maternal - offspring behaviour in sheep. The disease causes milk reduction, further leading to lambs preferentially sucking from the unaffected gland. However, no effects were seen in the growth of single lambs.

(d) The findings underline the need for confirmation of the health status of the mammary gland in future studies of lactational behaviour in sheep. Thus, procedures would be standardised and conflicting results in ethological research will be avoided.

Publications associated with the present thesis

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

- I. D.A. Gougoulis, I. Kyriazakis, G.C. Fthenakis (2007) "Patterns of maternal behaviour of ewes and sucking behaviour of lambs" *Journal of the hellenic veterinary medical Society*, in press.
- II. D.A. Gougoulis, I. Kyriazakis, A. Tzora, I.A. Taitzoglou, J.Skoufos, G.C. Fthenakis (2007). "Effects of lamb sucking on the bacterial flora of teat duct and mammary gland of ewes" *Reproduction in domestic Animals*, in press.
- III. D.A. Gougoulis, I. Kyriazakis, N. Papaioannou, E. Papadopoulos, I.A. Taitzoglou, G.C. Fthenakis (2008) "Effects of subclinical mastitis on patterns of maternal - offspring behaviour of dairy sheep" *The veterinary Journal*, in press.

ADVISORY COMMITTEE

Associate professor G.C. Fthenakis

Supervisor

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

Professor I. Kyriazakis

Member of the advisory committee

Department of Animal Husbandry and Nutrition, Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly

Associate professor I.A. Taitzoglou

Member of the advisory committee

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

EXAMINATION BOARD

Professor C. Boscov

School of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki

Professor N. Kokolis

School of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki

Professor I. Kyriazakis

Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly

Associate professor N. Papaioannou

School of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki

Associate professor G.C. Fthenakis

Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly

Associate professor I.A. Taitzoglou

School of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki

Assistant professor G.S. Amiridis

Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ - ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ	7
ABSTRACT	9
ADVISORY COMMITTEE - EXAMINATION BOARD	12
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	13
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	15
Πρόλογος- Σκοποί της παρούσας διατριβής	16
Ευχαριστίες	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ I	20
ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ	
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	21
B. ΠΡΟΤΥΠΑ ΜΗΤΡΙΚΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΠΡΟΒΑΤΙΝΩΝ ΚΑΙ	
ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΘΗΛΑΣΜΟΥ ΑΡΝΙΩΝ	22
Προετομασία των προβατίνων - Τοκετός	22
Έναρξη μητρικής συμπεριφοράς	24
Αναγνώριση μεταξύ προβατίνων και νεογέννητων αρνιών	26
Άλλα πρότυπα συμπεριφοράς προβατίνων και αρνιών	36
Νευρο-ενδοκρινολογική ρύθμιση της μητρικής συμπεριφοράς	42
ΚΕΦΑΛΑΙΟ II	45

ΠΡΟΤΥΠΑ ΜΗΤΡΙΚΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΘΗΛΑΣΜΟΥ ΣΕ ΠΡΟΒΑΤΑ ΚΑΡΑΓΚΟΥΝΙΚΗΣ ΦΥΛΗΣ	
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	46
B. ΠΡΟΤΥΠΑ ΜΗΤΡΙΚΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΘΗΛΑΣΜΟΥ	47
Υλικά και μέθοδοι	47
Αποτελέσματα	55
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ III	69
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΘΗΛΑΣΜΟΥ ΣΤΗ ΜΕΤΑΔΟΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΗ ΘΗΛΗ ΤΩΝ ΠΡΟΒΑΤΙΝΩΝ	
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	70
B. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΘΗΛΑΣΜΟΥ ΣΤΗ ΜΕΤΑΔΟΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	71
Υλικά και μέθοδοι	71
Αποτελέσματα	74
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV	79
ΣΥΝΕΠΕΙΕΣ ΤΗΣ ΥΠΟΚΛΙΝΙΚΗΣ ΜΑΣΤΙΤΙΔΑΣ ΣΤΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΘΗΛΑΣΜΟΥ	
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	80
B. ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΣΥΝΕΠΕΙΩΝ ΤΗΣ ΥΠΟΚΛΙΝΙΚΗΣ ΜΑΣΤΙΤΙΔΑΣ	81
Υλικά και μέθοδοι	81
Αποτελέσματα	88
 ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	96
Πρότυπα μητρικής συμπεριφοράς και συμπεριφοράς θηλασμού σε πρόβατα Καραγκούνικης φυλής	97
Επίδραση του θηλασμού στη μετάδοση βακτηρίων στη θηλή των προβατίνων	101
Συνέπειες της υποκλινικής μαστίτιδας στη συμπεριφορά θηλασμού	104
Επίλογος	106
 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ	108

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Πρόλογος - Σκοποί της παρούσας διατριβής

Τα νεογέννητα αρνιά, όπως όλα τα νεογέννητα θηλαστικά, έχουν ανάγκη από γάλα και ανοσολογική προστασία αμέσως μετά τον τοκετό. Έτσι καθίσταται επιτακτική η άμεση φροντίδα από τη μητέρα τους. Στις προβατίνες, η μητρική συμπεριφορά εκδηλώνεται για πρώτη φορά στον τοκετό. Η διατήρησή της κατά τη διάρκεια της γαλουχίας στηρίζεται σε πολύπλοκους μηχανισμούς αλληλεπίδρασης μεταξύ του νεογέννητου και της μητέρας που συμβάλλουν στην ανάπτυξη της μητρικής συμπεριφοράς (Nowak 1996).

Έτσι, η ανάπτυξη σταθερού δεσμού μεταξύ της προβατίνας και του(ων) νεογέννητου(ων) αρνιού(ών) της αποτελεί σημαντική εξελικτική διεργασία με σκοπό την προστασία του(ων) νεογέννητου(ων) και την αποκλειστική φροντίδα από την μητέρα του(ς). Όταν ο δεσμός αυτός είναι πολύ ισχυρός, συμβάλλει καθοριστικά στην επιβίωση των νεογέννητων.

Στην προβατοτροφία, η νεογνική θνησιμότητα αποτελεί ακόμη ένα σημαντικό νοσολογικό πρόβλημα. Με βάση την έως τώρα επιστημονική γνώση, υπεύθυνο για τη νεογνική θνησιμότητα θεωρείται το τρίπτυχο: αδυναμία πρόσληψης τροφής / ανεπαρκής μητρική φροντίδα / έκθεση σε αντίξοες συνθήκες. Σημαντικοί παράγοντες προδιάθεσης στη νεογνική θνησιμότητα είναι: η προγεννητική αδυναμία του νεογέννητου ως συνέπεια ανεπάρκειας του πλακούντα, η δυστοκία, η ανώμαλη συμπεριφορά μητέρας-νεογέννητου, οι κακές σταβλικές εγκαταστάσεις, η κακή ποιότητα πρωτογάλακτος, η ανεπαρκής ποσότητα γάλακτος και οι παθήσεις του μαστικού αδένου (Haughey 1991).

Η ανάπτυξη ενός σταθερού και αποκλειστικού δεσμού μεταξύ της προβατίνας και του(ων) νεογέννητου(ων) αρνιού(ών) προσείλκυσε το ενδιαφέρον των ερευνητών ήδη πριν από 50 χρόνια (Sojetado 1952, Munro 1956). Οι αρχικές μελέτες περιορίζονταν μόνο στην καταγραφή και περιγραφή των συμπεριφορών. Σε μετέπειτα έρευνες αναλύθηκαν οι μηχανισμοί που καθόριζαν την εκδήλωση του δεσμού αυτού και διερευνήθηκαν παράγοντες που μπορεί να τους επηρέαζαν (Keverne & Kendrick 1994, Kendrick, Da Costa, Broad, Ohkura, Guevara, Levy & Keverne 1997, Dwyer & Lawrence 1998).

Οι προσπάθειες αυτές συνέβαλαν στην ανάπτυξη και καθιέρωση διαχειριστικών παρεμβάσεων, οι οποίες οδήγησαν σε μείωση της νεογνικής θνησιμότητας (Henderson 2000, Nowak & Poindron 2006), σε αύξηση των αποδόσεων σε κρέας (Kaasschieter, Dejong, Schiere & Zwart 1992, Boyazoglu & Morand-Fehr 2001), σε βελτίωση της ευζωίας (Winter 2000) και σε διατήρηση της υγείας (Fitzpatrick, Scott & Nolan 2006) των προβάτων.

Όμως στη διαθέσιμη επιστημονική βιβλιογραφία, παρουσιάζονται μόνο μελέτες που αφορούν στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της συμπεριφοράς θηλασμού και της υγείας των

νεογέννητων αρνιών. Οι μελέτες αυτές έχουν πραγματοποιηθεί αποκλειστικά σε κρεοπαραγωγικές φυλές προβάτων. Δεν έχουν δημοσιευτεί μελέτες που αφορούν σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ συμπεριφοράς θηλασμού και υγείας του μαστικού αδένος σε προβατίνες.

Η παρούσα διατριβή εστιάζεται στη μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ της συμπεριφοράς του θηλασμού και της υγείας του μαστικού αδένος σε πρόβατα γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης. Η διατριβή αποσκοπεί:

- Στη μελέτη της δυναμικής της μόλυνσης του μαστικού αδένος κατά τη διαδικασία θηλασμού.
- Στη μελέτη της πιθανής μεταβολής της συμπεριφοράς θηλασμού σε περιπτώσεις υποκλινικής μαστίτιδας.

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στην Κλινική Μαιευτικής και Αναπαραγωγής του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η ερευνητική εργασία που περιγράφεται διήρκεσε από το χειμώνα του 2005 έως το καλοκαίρι του 2006 και η συγγραφή της διατριβής έλαβε χώρα κατά το 2006. Τα έξοδα της διατριβής καλύφθηκαν από τους πόρους της Κλινικής.

Τμήματα της ερευνητικής εργασίας που περιγράφονται στη διατριβή, πραγματοποιήθηκαν στη Γεωπονική Σχολή του Πανεπιστημίου του Εδιμβούργου, στον Τομέα Παθολογικής Ανατομικής και Λοιμωδών Νοσημάτων της Βασιλικής Κτηνιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου του Λονδίνου και στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Τμήματος Ζωικής Παραγωγής του Τεχνολογικού Εκπαιδευτικού Ιδρύματος Ηπείρου.

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ τον αναπληρωτή καθηγητή του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Γεώργιο Φθενάκη, ο οποίος μου έδωσε τη δυνατότητα να εκπονήσω αυτή τη διατριβή και την επέβλεψε, υποστηρίζοντάς με σε όλη τη διάρκειά της. Η συμβολή του ήταν σημαντική στην επιλογή του θέματος. Επίσης, τον ευχαριστώ για την ανεύρεση χρηματοδότησης για την πραγματοποίηση αυτής της εργασίας, καθώς και για τη συνεχή βοήθειά του σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής. Η υποστήριξή του ήταν καθοριστική για την ολοκλήρωση της διατριβής.

Ευχαριστώ επίσης τον καθηγητή του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Η. Κυριαζάκη για τις πολύτιμες συμβουλές και υποδείξεις του κατά την έναρξη της διατριβής και για τη συνεχή υποστήριξή του στη διάρκεια της εκπόνησής της. Ιδιαίτερα τον

ευχαριστώ για την εκπαίδευσή μου στην Κτηνιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου του Εδιμβούργου στη Σκωτία. Επίσης, ευχαριστώ τον αναπληρωτή καθηγητή της Κτηνιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης κ. Ι. Ταϊτζόγλου για την εμπιστοσύνη του και τη συμβολή του ως μέλους της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής της διατριβής.

Ευχαριστίες επίσης απευθύνω:

Στον αναπληρωτή καθηγητή της Κτηνιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης κ. Ν. Παπαϊωάννου, για την καθοδήγηση, τη συνεχή υποστήριξη και τη βοήθειά του.

Στο λέκτορα της Κτηνιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης κ. Χ. Βερβερίδη, για την εκπαίδευσή μου σε θέματα μαιευτικής και αναπαραγωγής και για την αμέριστη βοήθειά του στις δυσκολίες στη διάρκεια των πειραματικών μελετών μου.

Στη διδάσκουσα του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Β. Μαυρογιάννη για τις συμβουλές της σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής, δεδομένου ότι με την καθοδήγησή της εφάρμοσα μεθόδους που συντέλεσαν στις πειραματικές μελέτες της διατριβής αυτής.

Στην υποψήφια διδάκτορα κ. Η. Φράγκου για την αμέριστη βοήθειά της στη διάρκεια των πειραματικών μελετών.

Στην καθηγήτρια του Τμήματος Ζωικής Παραγωγής του Τεχνολογικού Εκπαιδευτικού Ιδρύματος Ηπείρου κ. Α. Τζώρα, για τις ταυτοποιήσεις των μικροοργανισμών που απομονώθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραματικών μελετών.

Στον επίκουρο καθηγητή της Κτηνιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης κ. Η. Παπαδόπουλο για την διενέργεια παρασιτολογικών εξετάσεων στις πειραματικές μελέτες της διατριβής.

Στη διδάκτορα κ. Ε. Βαλάση για τις υποδείξεις στη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Στον κτηνοτρόφο κ. Χ. Κερασιώτη για την προθυμία στην κάλυψη των αναγκών σε πειραματόζωα.

Στη λέκτορα του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Π. Γκουλέτσου, για τη βοήθεια και τις συμβουλές της στην απεικονιστική εξέταση των ζώων.

Στον υποψήφιο διδάκτορα κ. Δ. Δούκα, για τη βοήθειά του στις νεκροτομές των ζώων.

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

Στην παρασκευάστρια της Βασιλικής Κτηνιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Λονδίνου κ. S. Rodway, για την παρασκευή δειγμάτων για την ιστοπαθολογική εξέταση.

Στην κ. Φ. Ριζάβα και στον κ. Α. Τρούκη, για τη φροντίδα των πειραματοζώων.

Τέλος, ευχαριστώ τους γονείς μου, που με στήριξαν σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου οικονομικά και ψυχολογικά για να ξεπεραστούν οι δυσκολίες που αντιμετώπισα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Αμέσως μετά τον τοκετό, η γρήγορη και επιτυχής αναγνώριση του νεογέννητου αρνιού και η αποδοχή του από τη μητέρα του αποτελούν σημαντικές παραμέτρους για τη μείωση της συχνότητας νεογνικών θανάτων. Η εκδήλωση αυτής της σχέσης είναι το αποτέλεσμα μακρόχρονης εξελικτικής διεργασίας για την επιβίωση και την εξέλιξη των προβάτων. Η σχέση αυτή υποβοηθά την καλύτερη ανάπτυξη των αρνιών. Έτσι επιβεβαιώνεται και η σημασία της μελέτης της συμπεριφοράς των ζώων στα δεδομένα της υγείας και της παραγωγής.

Τα αρνιά είναι ικανά να ακολουθούν τη μητέρα τους σχεδόν αμέσως μετά τον τοκετό. Σε εκτατικές συνθήκες εκτροφής τα πρόβατα βρίσκονται σε συνεχή αναζήτηση τροφής, προφυλασσόμενα ταυτόχρονα από τους φυσικούς θηρευτές τους (Nowak 1990). Επιπλέον, καθώς οι περισσότεροι τοκετοί λαμβάνουν χώρα σε συγκεκριμένη εποχή, συνυπάρχουν πολλά νεογέννητα ζώα στο κοπάδι, οπότε υπάρχει το ενδεχόμενο το γάλα μίας προβατίνας να καταναλώνεται και από άλλα αρνιά. Γι' αυτό, είναι απαραίτητη η γρήγορη ανάπτυξη δεσμού μεταξύ της μητέρας και του νεογέννητου. Επιπλέον, οι προβατίνες έχουν την ικανότητα αναγνώρισης του νεογέννητού τους, απομακρύνοντας ξένα αρνιά που πιθανόν πλησιάζουν σε αυτές για να θηλάσουν. Έτσι, η ανάπτυξη ισχυρού δεσμού μεταξύ των προβατίνων και των νεογέννητων αρνιών τους μέσα σε λίγες ώρες μετά τον τοκετό, αποτελεί σημαντική συμπεριφορά αυτού του ζωικού είδους (Alexander & Stevens 1981, Nowak & Lindsay 1992, Nowak, Porter, Levy, Orgeur & Schaal 2000).

Ο δεσμός εκδηλώνεται, διαμορφώνεται και εξελίσσεται ως εξής (Nowak και συν. 2000).

- Αναγνώριση, αποδοχή και περιποίηση των νεογέννητων αρνιών από την προβατίνα.
- Αναγνώριση της προβατίνας από τα αρνιά και προσπάθεια για τον πρώτο θηλασμό.
- Ανάπτυξη στενής σχέσης μεταξύ προβατίνων και αρνιών.

Για την ολοκλήρωση αυτών των σταδίων, εμπλέκονται πολύπλοκοι ενδοκρινολογικοί και νευρολογικοί μηχανισμοί, στις προβατίνες και στα νεογέννητα αρνιά, με τους οποίους ερμηνεύονται εσωτερικά και εξωτερικά ερεθίσματα. Στην ανασκόπηση αυτή θα παρουσιαστούν οι εκδηλώσεις της μητρικής συμπεριφοράς των προβατίνων και της συμπεριφοράς θηλασμού των αρνιών τους, καθώς και οι παράγοντες οι οποίοι πιθανόν τις επηρεάζουν.

B. ΠΡΟΤΥΠΑ ΜΗΤΡΙΚΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΠΡΟΒΑΤΙΝΩΝ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΘΗΛΑΣΜΟΥ ΑΡΝΙΩΝ

Προετοιμασία των προβατινών - Τοκετός

Στις προβατίνες, η εγκυμοσύνη διαρκεί 140 έως 155 ημέρες (Τσακάλωφ 1998, Noakes 2001). Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που επιδρούν στη διάρκεια της κύησης: η ηλικία της προβατίνας, η διατροφή της στη διάρκεια της εγκυμοσύνης, το φύλο των εμβρύων, ο αριθμός των εμβρύων και η εποχή του έτους (Τσακάλωφ 1998, Noakes 2001). Μετά την 140η ημέρα της κύησης και καθώς πλησιάζει ο τοκετός, έχουν περιγραφεί αλλαγές στη συμπεριφορά των προβατινών (Nowak και συν. 2000).

Συγκεκριμένα, οι προβατίνες κινούνται λιγότερο, προτιμώντας να βρίσκονται περισσότερη ώρα σε κατάκλιση. Τις τελευταίες ημέρες ειδικότερα, οι έγκυες προβατίνες απομονώνονται από το κοπάδι, ευρισκόμενες σε κάποια απόσταση από αυτό. Σε ομάδες ζώων που βοσκούν, είναι συνήθης η παρέκκλισή τους από την κύρια πορεία της ομάδας. Σε νομαδικά κοπάδια όπου δεν λαμβάνεται κάποια ιδιαίτερη μέριμνα για επίτοκα ζώα, είναι δυνατόν μία προβατίνα να σταματήσει την πορεία της γεννώντας επιτόπου (Smith 1965, Gonyou & Stookey 1987).

Οντογενετικά, η παρατηρούμενη απομόνωση των επίτοκων ζώων αποτελεί το προκαταρκτικό βήμα για τη διαμόρφωση του δεσμού μεταξύ της μητέρας και του νεογέννητου, αφού τα προστατεύει από τους πιθανούς θηρευτές και συμβάλλει στη συνεχή και απρόσκοπτη ενασχόληση μεταξύ τους (Nowak και συν. 2000). Κατά το Smith (1965), η επιλογή απομονωμένου χώρου, που πιθανόν θα προφύλασσε από δύσκολες καιρικές συνθήκες, δεν είναι συνηθισμένη, εκτός εάν επικρατούν ιδιαίτερα αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες. Όταν όμως γίνεται, φαίνεται ότι ο χώρος επιλέγεται με βάση τις ανάγκες των εγκύων και όχι τις μελλοντικές ανάγκες των αρνιών τους (Gonyou & Stookey 1983). Οι Pollard, Shaw και Littlejohn (1999) ανέφεραν ότι αναζήτηση χώρου διαβίωσης παρουσιαζόταν συνηθέστερα μετά τον τοκετό.

Καθώς ο τοκετός πλησιάζει, οι προβατίνες συχνά γυρίζουν το κεφάλι τους προς τους κενεώνες, καταναλώνουν τροφή και μηρυκάζουν συχνότερα, περνούν περισσότερο χρόνο σε κατάκλιση, παρουσιάζουν συχνές αλλαγές στάσης (συχνές κατακλίσεις και ανεγέρσεις, άσκοπες κινήσεις) και "ελέγχουν" (οσμίζονται, σκαλίζουν με τα πρόσθια άκρα) μία συγκεκριμένη περιοχή

(Arnold & Morgan 1975, Gonyou & Stookey 1987). Εάν δεν ενοχληθούν έντονα, σπάνια αποχωρούν από εκείνη την περιοχή (Smith 1965).

Με την έξοδο περιεχομένου της μήτρας από τη γεννητική οδό, λαμβάνουν χώρα συχνές εκτάσεις του σώματος με τα πρόσθια άκρα λυγισμένα και την κεφαλή σε κάμψη. Οι επίτοκες προβατίνες λαμβάνουν θέση κατάκλισης σε μία πλευρά, κάμπτοντας την κεφαλή προς τα πίσω. Σε αυτό το στάδιο λαμβάνει χώρα η έξοδος των εμβρυϊκών υγρών και αργότερα, η πρώτη, μερική εμφάνιση της κεφαλής ή των άκρων του εμβρύου. Οι Arnold και Morgan (1975) ανέφεραν ότι η πλειονότητα των προβατίνων γεννούσαν στο σημείο όπου έγινε η πρώτη έξοδος υγρών από την γεννητική οδό. Αν και οι περισσότερες προβατίνες γεννούν σε κατάκλιση, αρκετά (έως 28%) ζώα παραμένουν όρθια σε όλη την διάρκεια του τοκετού. Σημειώνεται ότι λίγο πριν από την έξοδο των οπισθίων άκρων του εμβρύου (σε περίπτωση κεφαλικής προβολής του), οι προβατίνες σηκώνονται για την τελική εξώθηση των εμβρύων (Arnold & Morgan 1975).

Οι ερευνητές δε συμφωνούν ως προς τη χρονική στιγμή της ημέρας, όπου λαμβάνουν χώρα οι περισσότεροι τοκετοί. Ο George (1969) ανέφερε ότι προβατίνες φυλής Merino γεννούσαν συνηθέστερα την ημέρα, ενώ αντίθετα προβατίνες της φυλής Dorset-Horn γεννούσαν στη διάρκεια της νύχτας. Οι Arnold και Morgan (1975) ανέφεραν ότι οι τοκετοί κατανέμονταν σε όλη την διάρκεια του 24ωρου. Οι Dwyer και Lawrence (1998) παρατήρησαν ότι οι περισσότερες προβατίνες γεννούσαν κατά την διάρκεια της ημέρας και εξήγησαν αυτήν την τάση ως συνέπεια της φυσικής ανάγκης των προβάτων για προστασία από τους θηρευτές τους, η οποία μπορεί να εκπληρωθεί καλύτερα με το φως της ημέρας. Πάντως θεωρείται ότι διάφοροι παράγοντες (π.χ. η ώρα χορήγησης τροφής) επηρεάζουν την ώρα του τοκετού (Dwyer & Lawrence 1998).

Σύμφωνα με τους Arnold και Morgan (1975) και τον Τσακάλωφ (1998), το δεύτερο στάδιο του τοκετού συνήθως διαρκεί 1 h, σπάνια δε υπερβαίνει τις 2 h. Σύμφωνα με τους Dwyer και Lawrence (1998), σε περιπτώσεις διδυμης κύησης η έξοδος του δεύτερου εμβρύου ολοκληρώνεται 45 min μετά την έξοδο του πρώτου. Οι Arnold και Morgan (1975) και ο Haughey (1991) ανέφεραν ότι το μεσοδιάστημα γέννησης μεταξύ των δύο εμβρύων μπορούσε να φθάσει έως 3 h, σπάνια όμως υπερέβαινε τα 45 min. Βέβαια, η διαδικασία εξόδου του δεύτερου εμβρύου διαρκεί λιγότερο από του πρώτου, καθώς η γεννητική οδός της προβατίνας είναι ήδη έτοιμη.

Η διάρκεια του τοκετού επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες. Οι Dwyer, Lawrence, Brown και Simm (1996) και οι Dwyer και Lawrence (1998) ανέφεραν ότι σε προβατίνες φυλής Scottish-Blackface ο τοκετός διαρκούσε λιγότερο απ' ό,τι σε προβατίνες φυλής Suffolk, οι δε Fahmy, Roberts και Castonguay (1997) ανέφεραν ότι σε καθαρόαιμες προβατίνες αναπαραγωγής φυλών Finnish, Romanov και Suffolk, ο τοκετός διαρκούσε λιγότερο απ' ό,τι σε

ζώα ίδιων φυλών που χρησιμοποιούνταν σε εμπορικές εκτροφές. Οι Cloete, Olivier, Schlotz, ten Hoope, Lombard και Franken (1998) παρατήρησαν ότι σε περίπτωση κύησης αρσενικών εμβρύων, ο τοκετός διαρκούσε περισσότερο απ' ότι σε περίπτωση κύησης θηλυκών. Οι Cloete, Scholtz, Gilmour και Olivier (2002) ανέφεραν ότι η διάρκεια του τοκετού μειωνόταν αντιστρόφως ανάλογα προς την ηλικία της προβατίνας. Τέλος, οι Dwyer, Lawrence, Bishop και Lewis (2003) κατέγραψαν σε προβατίνες με ελλιπή διατροφή στη διάρκεια της κυοφορίας, αυξημένη διάρκεια τοκετού και συνακόλουθα, ανάλογη αύξηση της συχνότητας μαιευτικών επεμβάσεων.

Έναρξη μητρικής συμπεριφοράς

Αμέσως μετά τη γέννηση των αρνιών, οι προβατίνες γυρίζουν προς το μέρος τους και αρχίζουν την περιποίηση τους εκδηλώνοντας μία απόλυτα ειδική συμπεριφορά. Συγκεκριμένα, γλύφουν όλο το σώμα κάθε νεογέννητου, συνηθέστερα ξεκινώντας από την κεφαλή και καταλήγοντας στην περιοχή του περινέου (McGlone & Stobart 1986). Η διαδικασία αυτή είναι ιδιαίτερα έντονη αμέσως μετά την έξοδο των εμβρύων και μειώνεται σταδιακά με το πέρασμα του χρόνου (Vince, Lynch, Motterhead, Green & Elwin 1987). Με τον τρόπο αυτό, οι προβατίνες στεγνώνουν τα νεογέννητα από τα εμβρυϊκά υγρά, αυξάνουν τη θερμοκρασία του σώματός τους, απελευθερώνουν την αναπνευστική οδό από υπολείμματα εμβρυϊκών υγρών ή εμβρυϊκών υμένων, ενεργοποιούν δε την αναπνευστική λειτουργία και τη γενικότερη κινητικότητα των νεογέννητων. Επιπλέον δημιουργείται ο δεσμός μεταξύ μητέρας - νεογέννητου και υποβοηθάται η περαιτέρω αναγνώριση των αρνιών από τις προβατίνες (Levy & Poindron 1987).

Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, οι προβατίνες τρώγουν τους εμβρυϊκούς υμένες και γλύφουν τα εμβρυϊκά υγρά. Η συμπεριφορά αυτή παρατηρείται μόνο στην περιτοκιαία περίοδο. Σε οποιοδήποτε άλλο στάδιο της ζωής τους, οι προβατίνες εκδηλώνουν έντονη αποστροφή προς τους εμβρυϊκούς υμένες (Levy, Poindron & Le Neindre 1983). Η κατανάλωση των εμβρυϊκών υμένων από τις προβατίνες θεωρήθηκε ως προσπάθεια εξαφάνισης όλων των υπολειμμάτων του τοκετού, τα οποία θα προσείλκυαν θηρευτές (Nowak και συν. 2000).

Μετά τον καθαρισμό των νεογέννητων, οι προβατίνες συνεχίζουν να τα ακουμπούν με το ακρορρινό τους, σπρώχνοντάς τα και παροτρύνοντάς τα να σηκωθούν και να θηλάσουν (Sharafeldin & Kandeel 1971). Γενικά, υπάρχουν αντικρουόμενες απόψεις ως προς την κατανομή του χρόνου, τον οποίο αφιερώνει μία προβατίνα σε καθένα από τα νεογέννητά της. Κάποιοι ερευνητές υποστήριξαν ότι ο χρόνος επιμέλειας κατανεμόταν ισόχρονα σε όλα τα νεογέννητα ανεξάρτητα από τη σειρά γέννησής τους (Owens, Bindon, Edey & Piper 1985), ενώ

άλλοι ανέφεραν προοδευτική μείωση του χρόνου επιμέλειας σε κάθε νέο αρνί (Holmes 1976, Atroshi & Osterberg 1979). Σε περιπτώσεις διδυμίας, καταγράφηκε έντονη μείωση της φροντίδας στο πρώτο αρνί μετά τη γέννηση του δεύτερου (Dwyer & Lawrence 1998). Μάλιστα, ακόμη και το αρνί που γεννήθηκε πρώτο, δεχόταν λιγότερη φροντίδα από ένα μονόδυμο (O'Connor, Lawrence & Woodgush 1992).

Η ηλικία και συνακόλουθα η εμπειρία των προβατίνων είναι σημαντικοί παράγοντες για τη μητρική συμπεριφορά τους. Έχει βρεθεί ότι προβατίνες που γεννούσαν για πρώτη φορά καθυστερούσαν την εκδήλωση της μητρικής συμπεριφοράς τους και εμφάνιζαν μεγάλη συχνότητα απόρριψης των νεογέννητων (Sharafeldin & Kandeel 1971, Dwyer & Lawrence 2000, Dwyer 2003). Επιπλέον, βρέθηκε ότι πολύτοκες προβατίνες ενάλλασαν γρηγορότερα τη φροντίδα τους μεταξύ των αρνιών τους, σε σχέση με πρωτότοκες (O'Connor και συν. 1992).

Η φυλή φαίνεται ότι παίζει και αυτή ρόλο στη μητρική φροντίδα. Σύμφωνα με τους Dwyer και Lawrence (1998), οι προβατίνες της φυλής Suffolk φρόντιζαν σημαντικά λιγότερο τα νεογέννητά τους απ' ό,τι οι προβατίνες της φυλής Scottish-Blackface. Επιπρόσθετα, μεταξύ των φυλών αναφέρονται και διαφορές στον τρόπο εκδήλωσης της μητρικής συμπεριφοράς: οι ίδιοι ερευνητές ανέφεραν ότι οι προβατίνες Suffolk φρόντιζαν τα νεογέννητά τους για μικρά χρονικά διαστήματα με συνεχείς κινήσεις γύρω τους, σε αντίθεση με τις προβατίνες Scottish-Blackface, οι οποίες στέκονταν ακίνητες φροντίζοντας συνεχώς και έντονα τα αρνιά τους. Επίσης, οι Kuchel και Lindsay (1999) παρατήρησαν ότι σε εριοπαραγωγές προβατίνες, η μητρική φροντίδα ήταν σημαντικά λιγότερη σε ζώα με άριστη ποιότητα ερίου. Αυτή η διαφορά στην ποιότητα της μητρικής συμπεριφοράς πιθανόν οφείλεται στη συνεχή βελτίωση των παραγωγικών χαρακτηριστικών με την επιλογή των ζώων, οπότε τα χαρακτηριστικά της μητρικής συμπεριφοράς αμβλύνονται. Ανάλογα ευρήματα έχουν αναφερθεί και σε άλλα είδη ζώων, όπως οι χοίροι και τα βοοειδή, όπου παρατηρήθηκε ότι ζώα με υψηλά παραγωγικά χαρακτηριστικά εκδήλωναν ελλιπή μητρική συμπεριφορά (Le Neindre 1989, Meunier-Salaun, Gort, Prunier & Schouten 1991)

Επίσης, η εμπειρία θεωρείται ότι βελτιώνει την εκδήλωση της μητρικής συμπεριφοράς (O'Connor και συν. 1992), καθώς η ωρίμανση των νευροφυσιολογικών διεργασιών με την ηλικία υποβοηθά τη μητρική συμπεριφορά (Kendrick, Levy & Keverne 1991, Levy Kendrick, Keverne, Piketty & Poindron 1992). Επιπλέον, η ένταση και η ποιότητα της μητρικής φροντίδας επηρεάζονται και από τη διατροφή των προβατίνων κατά τη διάρκεια της κύησης. Θεωρείται ότι προβατίνες με ελλιπή διατροφή κατά την κύηση, εκδήλωναν στη συνέχεια μειωμένη μητρική φροντίδα (Dwyer και συν. 2003).

Η περιποίηση των νεογέννητων αρνιών από την μητέρα τους συμβάλλει καθοριστικά στην επιβίωσή τους. Επιπλέον, αποσκοπεί στην ανάπτυξη ενός πολύ ισχυρού μεταξύ τους δεσμού, που αναπτύσσεται με βάση ακουστικά, οπτικά και κυρίως οσφρητικά ερεθίσματα και αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο ζώων. Η παραμονή των προβατίνων σε στενή σχέση με τα νεογέννητα αρνιά τους επί τουλάχιστον 6 h μετά τον τοκετό, οδηγεί σε άριστη ανάπτυξη του μεταξύ τους δεσμού, μειώνοντας σημαντικά την πιθανότητα θανάτου των νεογέννητων (Nowak 1996). Όλες αυτές οι παρατηρήσεις συμφωνούν με τη γενικότερη θεωρία ότι σε περίπτωση τοκετού με επιπλοκές ή με μεγάλη διάρκεια, δεδομένης της καταπόνησης της μητέρας και των νεογέννητων και εξαιτίας της ελλιπούς επιμέλειας που δέχονται τα νεογέννητα, υπάρχει αύξηση της θνησιμότητάς τους (Haughey 1991, Dwyer & Lawrence 1998).

Αναγνώριση μεταξύ προβατίνων και νεογέννητων αρνιών

Εισαγωγή

Ουσιαστικά υπάρχουν δύο τύποι αναγνώρισης των νεογέννητων αρνιών από τις προβατίνες. Ο ένας αναφέρεται στην αναγνώριση από απόσταση χρησιμοποιώντας οπτικά και ακουστικά ερεθίσματα. Ο δεύτερος αναφέρεται στην εκ του σύνεγγυς αναγνώριση, η οποία αποτελεί τον τελευταίο "έλεγχο" των αρνιών πριν από την αποδοχή τους για θηλασμό, χρησιμοποιώντας οσφρητικά ερεθίσματα. Η διαδικασία αναγνώρισης μεταξύ προβατίνων και νεογέννητων αρνιών λαμβάνει χώρα μέσω οπτικών, ακουστικών και οσφρητικών ερεθισμάτων και διαμορφώνεται στις πρώτες 24 h μετά τον τοκετό. Θεωρείται ότι τα ερεθίσματα αυτά δρουν ανεξάρτητα μεν, αλλά συμπληρωματικά μεταξύ τους, δεδομένου ότι κάθε είδος ερεθίσματος επιτρέπει από μόνο του την αναγνώριση των αρνιών από την προβατίνα (Keller, Meurisse, Poindron, Nowak, Ferreira, Shayit & Levy 2003, Searby & Jouventin 2003).

Ηχητικά ερεθίσματα και ακουστική αναγνώριση μεταξύ προβατίνων και αρνιών

Τα πρόβατα χρησιμοποιούν σε μειωμένο βαθμό τη φωνητική επικοινωνία, ώστε να μην αποκαλύπτεται η θέση τους στους θηρευτές τους. Έτσι, έχουν αναπτύξει έναν τρόπο επικοινωνίας που βασίζεται κυρίως στις κινήσεις και στις στάσεις του σώματος. Μολοταύτα, τα φωνητικά ερεθίσματα χρησιμοποιούνται για αναγνώριση από απόσταση μεταξύ προβατίνων και

αρνιών, καθώς και ως συμπληρωματικός παράγοντας στην οπτική αναγνώριση (Alexander & Shillito 1977, Shillito-Walser 1978, Searby & Jouventin 2003). Επιπλέον, στα αρνιά οι φωνητικές εκδηλώσεις αποτελούν εκδηλώσεις ανάγκης (π.χ. πείνα) ή δύσκολης κατάστασης (π.χ. αποχωρισμός από τη μητέρα).

Αμέσως μετά τον τοκετό ακολουθεί περίοδος έντονων φωνητικών εκδηλώσεων από τα ζώα. Σε κάποιες φυλές προβάτων, οι οποίες φυσιολογικά θεωρούνται ως "ήσυχες" αρχίζουν συχνότερα φωνητικές εκδηλώσεις ("βελάσματα") μετά τον τοκετό, ενώ σε άλλες φυλές παρατηρούνται σχεδόν συνεχώς ανάλογες φωνητικές εκδηλώσεις (Shillito 1972). Ταυτόχρονα με τον καθαρισμό των αρνιών, οι προβατίνες παράγουν ήχους χαμηλής έντασης με κλειστό το στόμα, οι οποίοι μάλιστα συνοδεύονται από αντίστοιχους ήχους των νεογέννητων. Οι ήχοι αυτοί παράγονται μόνο στην αμέσως μετά τον τοκετό περίοδο και έχουν σημασία στην ανάπτυξη δεσμού με τα νεογέννητα αρνιά, αλλά και στη γενικότερη φροντίδα τους (Smith 1965, Dwyer, McLean, Dean, Chirnside, Calvert & Lawrence 1998). Καθώς αυτοί οι χαμηλής έντασης ήχοι δε γίνονται αντιληπτοί από μεγάλη απόσταση, δεν αποκαλύπτεται έτσι η θέση των ζώων (μητέρας και νεογέννητων), οπότε δεν κινδυνεύουν από τους θηρευτές τους. Θεωρείται λοιπόν ότι τα χαμηλής έντασης ακουστικά ερεθίσματα βοηθούν στην ανάπτυξη πρώτης επαφής μεταξύ των αρνιών και των προβατίνων και συμμετέχουν στην εκ του σύνεγγυς αναγνώριση (Terrazas, Nowak, Serafin, Ferreira, Levy & Poindron 2002).

Φωνητική συμπεριφορά της μητέρας

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την εκδήλωση των χαμηλής έντασης ήχων αφορούν κυρίως στις προβατίνες: εμπειρία και φυλή. Αντίθετα, χαρακτηριστικά που αφορούν στα νεογέννητα, π.χ. μέγεθος τοκετοομάδας ή φυλή (σε περίπτωση βέβαια μεταφοράς εμβρύων από πρόβατα άλλης φυλής), έχουν μικρή επίδραση. Για παράδειγμα, οι πρωτότοκες προβατίνες εκδηλώνουν ήχους πιο συχνά από τις πολύτοκες (Dwyer και συν. 1998). Γενικότερα πάντως θεωρείται ότι προβατίνες φυλών με μικρότερη εξέλιξη και εξημέρωση (όπως η φυλή Scottish-Blackface), οι οποίες μάλιστα θεωρούνται καλύτερες μητέρες, εκδηλώνουν πιο συχνά ήχους χαμηλής έντασης (Dwyer και συν. 1998).

Σύμφωνα με τους Dwyer και συν. (1998), οι διαφορές μεταξύ προβατίνων ίδιας φυλής αλλά διαφορετικής ηλικίας και εμπειρίας, αποδεικνύουν ότι η εμπειρία της επιμέλειας ενός νεογέννητου αρνιού έχει σημαντική επίδραση στη φωνητική συμπεριφορά των προβατίνων. Οι Poindron, Nowak, Levy, Porter και Schaal (1993) ανέφεραν ότι σε πρωτότοκες προβατίνες, όπου ο δεσμός με τα νεογέννητα αναπτυσσόταν με αργό ρυθμό, ήταν απαραίτητη η παραμονή των νεογέννητων κοντά στις μητέρες τους για μεγάλη χρονική διάρκεια. Παρατηρήθηκε ότι

νεογέννητα αρνιά έκαναν λιγότερες προσπάθειες έγερσης όταν άκουγαν μαγνητοφωνημένους ήχους χαμηλής έντασης, σε σχέση με άλλα αρνιά που δεν άκουγαν τέτοιους ήχους. Έτσι θεωρήθηκε ότι οι χαμηλής έντασης ήχοι μείωναν τη δραστηριότητα των αρνιών (Vince 1986). Αυτή η συμπεριφορά φαίνεται ότι βοηθά τις άπειρες πρωτότοκες προβατίνες, για τις οποίες έχει βρεθεί ότι εκδήλωναν περιστατικά αρνητικής συμπεριφοράς σε πολύ δραστήρια αρνιά, προτιμώντας να φροντίζουν λιγότερο δραστήρια νεογέννητα (Dwyer και συν. 1998).

Οι Levy και Poindron (1987) ανέφεραν ότι σε πρωτότοκες προβατίνες μειώθηκαν οι ήχοι χαμηλής έντασης μετά τον καθαρισμό των νεογέννητων και τη συνακόλουθη αποδρομή της χαρακτηριστικής οσμής των εμβρυϊκών υγρών. Έτσι θεωρήθηκε ότι οι ήχοι αυτοί ήταν ορμονοεξαρτώμενοι και επηρεάζονταν από την παρουσία και την οσμή του αρνιού, αλλά όχι από τα χαρακτηριστικά του (Dwyer και συν. 1998). Σημειώνεται ότι οι μαιευτικές επεμβάσεις ακολουθούνται συνήθως από μείωση της συχνότητας αυτών των ήχων (Dwyer 2003), μάλλον διότι συνοδεύονται από κτηνιατρική νεογνική φροντίδα, με την οποία αλλοιώνεται η διαδικασία αναγνώρισης.

Οι ήχοι υψηλής έντασης θεωρούνται αντίδραση σε έντονη ενόχληση, παρατηρούνται δε κυρίως σε περιπτώσεις αποχωρισμού, καθώς οι προβατίνες καλούν τα αρνιά κοντά τους (Shillito-Walser, Walters & Ellison 1984, Terrazas και συν. 2002). Η συχνότητα των ήχων αυξάνεται με την πρόοδο της γαλακτικής περιόδου: καθώς τα αρνιά γίνονται περισσότερο δραστήρια, καταγράφονται περισσότερα επεισόδια απομάκρυνσής τους από τις προβατίνες, οι οποίες πλέον τα καλούν να επιστρέψουν. Γι' αυτό και σε μεγάλες τοκετομάδες, όπου παρατηρούνται συχνότερα απομακρύνσεις των αρνιών, καταγράφεται και αυξημένη φωνητική δραστηριότητα των προβατίνων μετά τον τοκετό (Pollard 1992). Οι Terrazas και συν. (2002) παρατήρησαν ότι οι προβατίνες εκδήλωναν ήχους υψηλής έντασης όταν τις προσέγγιζε ξένο αρνί και θεώρησαν ότι οι φωνητικές συμπεριφορές εξυπηρετούσαν και την αναγνώριση των προβατίνων από τα αρνιά.

Κάθε αρνί αναπτύσσει σταδιακά την ικανότητα αναγνώρισης της μητέρας του, με βάση τα φωνητικά χαρακτηριστικά της. Η λειτουργία αυτή ολοκληρώνεται σε ηλικία δύο έως τριών ημερών (Terrazas και συν. 2002), λαμβάνει δε χώρα σε δύο χρόνους. Στον πρώτο χρόνο, οι προβατίνες εκδηλώνουν υψηλής έντασης φωνητικές εκδηλώσεις προκειμένου να προσελκύσουν τα απομακρυσμένα αρνιά. Στη συνέχεια και μόλις τα αρνιά φτάσουν κοντά τους, εκδηλώνουν χαμηλής έντασης ήχους, τους οποίους τα αρνιά έχουν συσχετίσει με θετική μητρική συμπεριφορά (Terrazas και συν. 2002). Αντίθετα, όταν ένα αρνί προσεγγίσει κάποια άλλη προβατίνα, η μητέρα του συνεχίζει τους ήχους υψηλής έντασης.

Θεωρείται ότι η φωνητική συμπεριφορά ως μέσο αναγνώρισης μεταξύ μητέρας - νεογέννητου είναι αυξημένη σε "εξελιγμένες" φυλές προβάτων (Shillito-Walser και συν. 1984, Dwyer και συν. 1996, Dwyer και συν. 1998), δηλαδή σε ζώα τα οποία κινδυνεύουν λιγότερο από θηρευτές. Αν και η θέση των προβάτων στη φύση ως θηρευόμενων ζώων, έχει επιβάλλει περιορισμένη χρήση της φωνητικής επικοινωνίας, η εξημέρωση και η γενετική βελτίωση έχουν οδηγήσει σε ανάπτυξη περισσότερων φωνητικών συμπεριφορών για ενίσχυση του δεσμού μητέρας - νεογέννητων (Nowak 1990).

Φωνητική συμπεριφορά των αρνιών

Η φωνητική συμπεριφορά των νεογέννητων αρνιών έχει και αυτή ιδιαίτερη σημασία, καθώς συμβάλλει καθοριστικά στην αναγνώριση και στην ανάπτυξη δεσμού με τις μητέρες τους, και συνακόλουθα στην επιβίωσή τους. Η συχνότητα φωνητικών εκδηλώσεων από τα νεογέννητα στα πρώτα 30 min της ζωής τους συσχετίζεται αντίστροφα με το χρόνο που αφιερώνουν οι μητέρες στη φροντίδα τους τις πρώτες 12 h μετά τη γέννησή τους. Έτσι, γίνεται αντιληπτό ότι οι ήχοι από τα νεογέννητα αρνιά αφενός βοηθούν στην ανάπτυξη του δεσμού με τις μητέρες τους και αφετέρου συντελούν στη μη απομάκρυνσή τους στην κρίσιμη εκείνη περίοδο (Nowak 1990). Η παρατήρηση αυτή βρίσκεται σε συμφωνία με τη άποψη των Weary και Fraser (1995), οι οποίοι παρατήρησαν ότι οι φωνητικές εκδηλώσεις των ζώων αντικατόπτριζαν ανάγκες τους και μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτης για τη φροντίδα που δέχονταν.

Η αναγνώριση των νεογέννητων αρνιών από τους ήχους τους στην πρώτη περίοδο της ζωής τους επηρεάζεται σημαντικά από την εμπειρία των προβατίνων. Οι φωνές ("βελάσματα") των αρνιών εξαρτώνται από τη φυλή και την εμπειρία της μητέρας τους, καθώς και από το μέγεθος της τοκετομάδας. Η συχνότητά τους είναι μεγαλύτερη σε αρνιά πρωτότοκων παρά πολύτοκων προβατίνων (Dwyer και συν. 1998). Ειδικότερα, οι Keller και συν. (2003) ανέφεραν ότι σε πολύτοκες προβατίνες η αναγνώριση των νεογέννητων με βάση τους ήχους τους ολοκληρωνόταν σε λιγότερο από 6 h μετά τον τοκετό, ενώ σε πρωτότοκες το διάστημα αυτό έφθανε τις 24 h. Το μεσοδιάστημα από τη γέννηση στον πρώτο επιτυχημένο θηλασμό είναι μεγαλύτερο σε αρνιά πρωτότοκων προβατίνων και συνεπώς, η αυξημένη συχνότητα φωνητικών συμπεριφορών από ένα νεογέννητο πιθανόν υποδηλώνει έλλειψη ή ανεπάρκεια θηλασμού (O'Connor και συν. 1992). Επιπρόσθετα, η γέννηση του δεύτερου αρνιού οδηγεί σε αύξηση της συχνότητας ήχων, καθώς η προβατίνα πρέπει να μοιράσει τη φροντίδα της μεταξύ δύο αρνιών (O'Connor και συν. 1992, Dwyer, Calvert, Farish, Donbav & Pickup 2005).

Οι προβατίνες αντιδρούν ιδιαίτερα σε φωνές από δικά τους αρνιά (Gonyou & Stookey 1987). Πάντως, η σχετική βιβλιογραφία είναι περιορισμένη και αντιφατική. Οι μεν Shillito-Walser,

Hague και Walters (1981) θεώρησαν ότι οι προβατίνες αναγνώριζαν ηχογραφημένους ήχους από τα αρνιά τους μόνο μετά από 2 εβδομάδες μετά από τη γέννησή τους, ενώ αντίθετα οι Terrazas, Ferreira, Levy, Nowak, Serafin, Orgeur, Soto και Poindron (1999) και οι Keller και συν. (2003) ανέφεραν ότι η ακουστική αναγνώριση των νεογέννητων λάμβανε χώρα εντός 6 h έως 8 h μετά από τον τοκετό.

Οπτική αναγνώριση μεταξύ προβατίνων και αρνιών

Οπτική αναγνώριση από τη μητέρα

Η δυνατότητα αναγνώρισης των αρνιών με βάση τα εξωτερικά χαρακτηριστικά τους αποτελεί σημαντική παράμετρο στην ανάπτυξη ισχυρού δεσμού μεταξύ της μητέρας και των νεογέννητων της. Σύμφωνα με τους Keller και συν. (2003), οι πολύτοκες προβατίνες μπορούν να αναγνωρίσουν τα νεογέννητά τους από σημαντική απόσταση (9 m έως 10 m) ήδη τις πρώτες 6 h μετά τον τοκετό. Αντίθετα για τις πρωτότοκες, το χρονικό αυτό διάστημα μπορεί να φτάσει και τις 24 h.

Η οπτική αναγνώριση δεν επηρεάζεται από τα ακουστικά και οσφρητικά χαρακτηριστικά των νεογέννητων, καθώς οι Ferreira, Terrazas, Poindron, Nowak, Orgeur και Levy (2000) ανέφεραν ότι προβατίνες χωρίς δυνατότητα όσφρησης, αναγνώριζαν οπτικά τα αρνιά τους όπως ακριβώς και οι φυσιολογικές. Επιπρόσθετα, οι προβατίνες μπορούν να εντοπίσουν τα αρνιά τους μόνο με την ύπαρξη οπτικών ερεθισμάτων, χωρίς να είναι απαραίτητη η ύπαρξη και ηχητικών (Alexander & Shillito 1977, Ferreira και συν. 2000).

Σύμφωνα με τους Alexander και Shillito (1977), τα οπτικά ερεθίσματα που βοηθούν τις προβατίνες να αναγνωρίσουν τα αρνιά τους, προέρχονται κυρίως από την περιοχή της κεφαλής των νεογέννητων. Επιπλέον, οι Alexander και Shillito (1978) ανέφεραν ότι όταν προβατίνες καλούνταν να επιλέξουν μεταξύ αναισθητοποιημένων νεογέννητων αρνιών (δηλαδή, ζώων που δεν συνεισέφεραν στη διαδικασία αναγνώρισης), επέλεξαν αρνιά ίδιου χρώματος με τα δικά τους. Οι ίδιοι ερευνητές ανέφεραν ότι οι προβατίνες ανέπτυσαν διαφορετική συμπεριφορά ακόμη και απέναντι στα δικά τους αρνιά, όταν αυτά χρωματίζονταν διαφορετικά.

Η εμπειρία των προβατίνων επηρεάζει σημαντικά τη διαδικασία οπτικής αναγνώρισης, αφού σύμφωνα με τους Keller και συν. (2003), αρκεί μόνον ένας προηγούμενος τοκετός για την επιτάχυνση της αναγνώρισης μέσω οπτικών χαρακτηριστικών. Για την ερμηνεία αυτής της διαφοράς παρουσιάστηκαν τρεις διαφορετικές υποθέσεις. Σύμφωνα με την πρώτη υπόθεση, η προηγούμενη εμπειρία του τοκετού αυξάνει την προσήλωση των προβατίνων σε κάποια οπτικά ή ηχητικά χαρακτηριστικά των νεογέννητων. Η δεύτερη υπόθεση βασίζεται στο γεγονός ότι η

εμπειρία (δηλαδή ο τοκετός) βελτιώνει την ικανότητα μάθησης, συμπεριλαμβανομένης και της μητρικής μάθησης. Τέλος, η τρίτη υπόθεση αναφέρεται στη συσχέτιση των οπτικών και ακουστικών ερεθισμάτων που απαιτούνται για την αναγνώριση των νεογέννητων: καθώς η πολύπλοκη διεργασία συσχετισμού είναι πιο δύσκολη από την αναγνώριση ενός μόνον είδους ερεθισμάτων, πιθανόν απαιτεί μητρική εμπειρία.

Οπτική αναγνώριση από τα αρνιά

Όσον αφορά στην αναγνώριση της μητέρας από τα αρνιά, ο σημαντικός ρόλος της όρασης αποδείχθηκε στις μελέτες του Bareham (1975) και των Vince και συν. (1987). Σε αυτές, τεκμηριώθηκε ότι τυφλά νεογέννητα σηκώνονταν πιο αργά, αποπροσανατολιζόνταν και έκαναν ελάχιστες προσπάθειες να αγγίξουν τη μητέρα τους ή να θηλάσουν, ακόμα και όταν οι προβατίνες εξακολουθούσαν να τα φροντίζουν. Επιπλέον, σε αρνιά ηλικίας 2 ημερών στα οποία τοποθετήθηκαν σκίαστρα στα μάτια τους, παρατηρήθηκε αδυναμία θηλασμού.

Τα αρνιά είναι ικανά να ξεχωρίσουν το μαστό της μητέρας τους σε 25 min έως 30 min μετά τη γέννησή τους (Slee & Springbett 1986, Vince και συν. 1987). Αρχικά όμως, η ικανότητά τους για οπτική αναγνώριση είναι περιορισμένη: έχει αποδειχθεί (Nowak 1990) ότι μπορούσαν να διακρίνουν τη μητέρα τους από άλλες προβατίνες μόνο σε πολύ κοντινή απόσταση (μικρότερη από 50 cm). Στις επόμενες δύο ημέρες όμως, μπορούν πλέον να αναγνωρίζουν τη μητέρα τους και από απόσταση αρκετών μέτρων (Nowak 1990).

Σε παρατηρήσεις σε πρόβατα φυλής Merino, βρέθηκε ότι αν και οι προβατίνες δεν αφιέρωναν πολύ χρόνο στην επιμέλεια των αρνιών τους, η απομάκρυνσή τους από αυτά γινόταν με αργές και σταδιακές κινήσεις, πάντα δε με στραμμένη την προσοχή τους στα αρνιά τους. Συνεπώς, την 1η ημέρα της ζωής τους τα αρνιά "μαθαίνουν" χαρακτηριστικά της μητέρας τους διακριτά από πολύ κοντινή απόσταση, τα οποία σε μακρινή απόσταση δεν θα είχαν καμία χρησιμότητα. Όμως τη 2η και την 3η ημέρα, καθώς ο αποχωρισμός των νεογέννητων από τις προβατίνες είναι πιο συχνός (Nowak 1990), οι προβατίνες και τα αρνιά τους αναγκάζονται να επικοινωνήσουν από απόσταση, και έτσι θεμελιώνεται η οπτική αναγνώριση της μητέρας από τα νεογέννητα.

Οι Terrazas και συν. (2002) ανέφεραν ότι αρνιά ηλικίας 1 ημέρας δεν διέκριναν τις ανοσμικές μητέρες τους από άλλες ανοσμικές προβατίνες, μπόρεσαν όμως να αναγνωρίσουν τις μητέρες τους όταν οι προβατίνες ήταν φυσιολογικές. Με βάση αυτή τη διαπίστωση μπορεί να θεωρηθεί ότι στην αναγνώριση των προβατίνων από τα νεογέννητα έχει συντελέσει και η επιλόχεια συμπεριφορά τους, οπότε η αναγνώριση δεν βασίζεται μόνο σε μορφολογικά χαρακτηριστικά. Οι Nowak και Lindsay (1992) ανέφεραν ότι σε δίδυμα αρνιά καθυστερούσε η

αναγνώριση της μητέρας τους σε σχέση με μονόδυμα. Δεδομένου ότι προβατίνες με δύο αρνιά αφιερώνουν λιγότερο χρόνο σε καθένα σε σχέση με προβατίνες με ένα αρνί, προφανώς τα δίδυμα αρνιά δεν έχουν επαρκή χρόνο για αφομοίωση της συμπεριφοράς και των μορφολογικών χαρακτηριστικών της μητέρας τους.

Τελικά φαίνεται ότι τα αρνιά αναπτύσσουν σταδιακά την ικανότητα αναγνώρισης των μητέρων τους, αρχικά βασιζόμενα κυρίως σε ηθολογικά χαρακτηριστικά τους, αργότερα όμως λαμβάνοντας υπόψη και τα ειδικότερα μορφολογικά χαρακτηριστικά.

Οσφρητικά ερεθίσματα και ρόλος τους στη μητρική συμπεριφορά

Η περιποίηση των νεογέννητων αμέσως μετά την έξοδό τους από τη γεννητική οδό συντελεί στην ανταλλαγή οσφρητικών ερεθισμάτων μεταξύ των προβατίνων και των αρνιών, η οποία θα οδηγήσει στην ανάπτυξη της οσφρητικής αναγνώρισης. Στην οσφρητική αναγνώριση συμμετέχουν δύο συστήματα: το κυρίως οσφρητικό και το συμπληρωματικό οσφρητικό (Keverne 1999, Booth & Katz 2000). Οι υποδοχείς του κυρίως οσφρητικού συστήματος είναι καταμεμημένοι σε όλην τη ρινική κοιλότητα. Το σύστημα συμμετέχει στην αναγνώριση ουσιών με πτητικά μόρια. Οι υποδοχείς του συμπληρωματικού οσφρητικού συστήματος εντοπίζονται στο ινιορρινικό όργανο (όργανο του Jacobson - vomeronasal organ), το οποίο βρίσκεται στη βάση του ρινικού διαφράγματος. Το σύστημα συμμετέχει στην αναγνώριση μη πτητικών ουσιών, κυρίως δε των φερομονών (Keverne 1999, Booth & Katz 2000).

Οσφρητική αναγνώριση από τη μητέρα

Αμέσως μετά τον τοκετό, οι προβατίνες "έλκονται" από την οσμή των εμβρυϊκών υγρών και των εμβρυϊκών υμένων και έτσι γλύφουν τα νεογέννητα, για να τους καταναλώσουν, ταυτόχρονα απομακρύνοντάς τους από τα νεογέννητα (Levy και συν. 1983). Τα πρώτα οσφρητικά ερεθίσματα από τα νεογέννητα προέρχονται ακριβώς από τους εμβρυϊκούς υμένες (Levy, Keller & Poindron 2004). Έτσι, ο καθαρισμός των νεογέννητων με νερό ή σαπούνι μείωσε σημαντικά τη μητρική φροντίδα. Μάλιστα σε πρωτότοκες προβατίνες, παρακωλύθηκε η αποδοχή των νεογέννητων και αυξήθηκε η επιθετική συμπεριφορά των μητέρων. Η προέλευση των εμβρυϊκών υμένων (δηλαδή εάν αφορούν σε αρνί αυτής της ίδιας ή κάποιας άλλης προβατίνας) δεν έχει καμία ουσιαστική επίδραση στην αποδοχή των νεογέννητων, αποδεικνύοντας έτσι ότι οι εμβρυϊκοί υμένες και τα εμβρυϊκά υγρά περιέχουν παράγοντες υπεύθυνους απλώς για την προσέλκυση των προβατίνων προς τα νεογέννητα και όχι για τη συνακόλουθη αναγνώρισή τους (Levy και συν. 2004). Ο ίδιος ερευνητής ανέφεραν ότι αν σε

κάποια προβατίνα, η οποία ήδη επιμελείτο ένα αρνί καλυπτόμενο από εμβρυϊκούς υμένες, παρουσιαζόταν και άλλο στεγνό αρνί (δηλαδή χωρίς εμβρυϊκούς υμένες ή εμβρυϊκά υγρά), η προβατίνα θα επιμελείτο και αυτό. Η παρατήρηση αυτή απέδειξε ότι τα εμβρυϊκά υγρά αποτελούσαν ένα έναυσμα για τη διαδικασία αποδοχής των νεογέννητων από τις μητέρες τους. Οσφρητικά ερεθίσματα από τα εμβρυϊκά υγρά είναι απαραίτητα για τη διασφάλιση της κατάλληλης μητρικής συμπεριφοράς μετά τον τοκετό (Levy και συν. 1983, Levy και συν. 2004).

Σημειώνεται ότι οι ανοσμικές προβατίνες δεν αποστρέφονται (ανεξάρτητα της αναπαραγωγικής περιόδου στην οποία βρίσκονται), αλλά ούτε προσελκύονται από τους εμβρυϊκούς υμένες (Levy και συν. 1983). Επιπλέον, η καταστροφή του ινιορρινικού οργάνου δεν είχε κάποια επίδραση στην αποστροφή - προσέλκυση των προβατίνων έναντι των εμβρυϊκών υμένων (Levy, Locatelli, Piketty, Tillet & Poindron 1995). Έτσι συνάγεται ότι όλη αυτή η διαδικασία ρυθμίζεται από το κυρίως οσφρητικό σύστημα, το οποίο θεωρείται το κατ' εξοχήν υπεύθυνο για την εκδήλωση της μητρικής συμπεριφοράς.

Όσον αφορά στην αναγνώριση των νεογέννητων από τις προβατίνες, παρατηρήθηκε ότι ζώα με βλάβες στο οσφρητικό σύστημά τους (π.χ. με εκτομή των οσφρητικών λοβών του εγκεφάλου, με διατομή των οσφρητικών νεύρων ή με καταστροφή του οσφρητικού επιθηλίου μετά από έκπλυση με θειικό ψευδάργυρο), αποδέχθηκαν ως δικό τους οποιοδήποτε αρνί τους προσκομίστηκε (Romeyer, Poindron & Orgeur 1994, Levy, Locatelli και συν. 1995). Επιπρόσθετα, αυτά τα ζώα αφιέρωσαν λιγότερο χρόνο επιμέλειας στα νεογέννητά τους και εκδήλωσαν λιγότερους ήχους χαμηλής έντασης και περισσότερους υψηλής (Levy και συν. 2004). Αντίθετα, ζώα στα οποία προκλήθηκαν αποκλειστικά βλάβες στο ινιορρινικό όργανο, δεν παρουσίασαν αλλαγές στη μητρική συμπεριφορά τους. Έτσι, θεωρήθηκε ότι το συμπληρωματικό οσφρητικό σύστημα μάλλον δεν συμμετείχε στη διαδικασία αναγνώρισης των νεογέννητων (Levy, Locatelli και συν. 1995). Μολοταύτα, άλλοι ερευνητές θεώρησαν ότι και τα δύο οσφρητικά συστήματα έπαιζαν ρόλο στη διαδικασία αναγνώρισης των νεογέννητων. Συγκεκριμένα, οι Booth και Katz (2000) και ο Booth (2006) ανέφεραν ότι προβατίνες με λειτουργικό ινιορρινικό όργανο και μη λειτουργικό οσφρητικό επιθήλιο εκδήλωναν μητρική συμπεριφορά όμοια με αυτήν των φυσιολογικών ζώων.

Η απομνημόνευση των ιδιαίτερων οσφρητικών χαρακτηριστικών των αρνιών αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για τη συμπεριφορά των προβατίνων. Πολύτοκες προβατίνες με ανέπαφο οσφρητικό βλεννογόνο, που δεν είχαν απομνημονεύσει την ιδιαίτερη οσμή των νεογέννητών τους (εξαιτίας της άμεσης απομάκρυνσής τους από αυτές), δεν επέδειξαν στη συνέχεια καλή μητρική συμπεριφορά όταν ξαναβρέθηκαν με τα αρνιά, έστω και αν εν τω μεταξύ είχαν οπτική και ακουστική επαφή μαζί τους (Poindron, Levy & Krehbiel 1988).

Με βάση τα παραπάνω, θεωρήθηκε ότι τα οσφρητικά ερεθίσματα συντελούσαν στην αναγνώριση των νεογέννητων σε δύο στάδια. Το πρώτο στάδιο λαμβάνει χώρα αμέσως μετά τον τοκετό. Σε αυτό, οι προβατίνες προσελκύνονται από τη χαρακτηριστική οσμή των εμβρυϊκών υμένων και υγρών και αρχίζουν τη φροντίδα των νεογέννητων. Το δεύτερο στάδιο λαμβάνει χώρα 2 h έως 4 h αργότερα. Σε αυτό, οι προβατίνες απομνημονεύουν την ιδιαίτερη οσμή των νεογέννητών τους, εκδηλώνοντας την αποδοχή τους και τη μητρική συμπεριφορά (Poindron, Le Neindre, Raksanyi, Trillat & Orgeur 1980, Porter, Levy, Poindron, Litterio, Schaal & Beyer 1991, Ferreira, Gervais, Durkin & Levy 1999, Keller και συν. 2003). Ο έλεγχος των αρνιών από τις προβατίνες μέσω της όσφρησης, αποτελεί πρωταρχικό παράγοντα για την ανάπτυξη της μητρικής αποδοχής, ιδιαίτερα κατά τις προσπάθειες θηλασμού που καταβάλλουν τα αρνιά. Αυτή η συμπεριφορά δεν παρατηρείται σε ανοσμικές προβατίνες, οι οποίες δεν μπορούν να αναγνωρίσουν τα νεογέννητά τους, αποδεχόμενες πλέον οποιαδήποτε αρνιά. Αυτή η σειρά παρατηρήσεων ενισχύει τη θεωρία ότι τις πρώτες ώρες μετά τον τοκετό, η μητρική συμπεριφορά καθορίζεται από την όσφρηση (Levy, Locatelly και συν. 1995α).

Καθώς όμως η γαλακτική περίοδος προχωρά, η μητρική συμπεριφορά καθορίζεται πλέον από περισσότερα συστήματα. Μετά την πάροδο κάποιου χρονικού διαστήματος (2 εβδομάδες), δεν τροποποιείται η μητρική συμπεριφορά των προβατινών, ακόμη και αν μεσολαβήσει καταστροφή του οσφρητικού επιθηλίου (Poindron & Le Neindre 1980) ή καθαρισμός των νεογέννητων με νερό ή σαπούνι (Alexander & Stevens 1981). Άλλωστε ένα μήνα μετά τον τοκετό, προβατίνες οι οποίες εν τω μεταξύ έγιναν ανοσμικές, αναγνώρισαν τα αρνιά τους μεταξύ πολλών (Ferreira και συν. 2000). Οι παρατηρήσεις αυτές αποδεικνύουν ότι προοδευτικά, η μητρική συμπεριφορά εξαρτάται και από άλλες αισθήσεις, οι οποίες πλέον μπορούν να καλύψουν την πιθανή απώλεια της όσφρησης (Ferreira και συν. 2000, Keller και συν. 2003, Poindron, Gilling, Hernez, Serafin & Terrazas 2003).

Οσφρητική αναγνώριση από τα αρνιά

Ο ρόλος της οσφρητικής αναγνώρισης από τα νεογέννητα δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως. Οι Vince και συν. (1987) βρήκαν ότι αμέσως μετά τον τοκετό, τα αρνιά αναζητούσαν τη θηλή σε οποιαδήποτε προβατίνα βρισκόταν κοντά τους. Επιπλέον, σε αρνιά που ψεκάστηκε αναισθητική ουσία στον οσφρητικό βλεννογόνο, αυξήθηκε σημαντικά το μεσοδιάστημα γέννησης - πρώτου επιτυχούς θηλασμού. Πιστεύεται ότι το έκκριμα των σηγγματογόνων αδένων στη βουβωνική περιοχή και στις βουβωνικές πτυχές της μητέρας δρα συνεργικά με απτικά ερεθίσματα, κατευθύνοντας τα αρνιά στην ανεύρεση της θηλής (Nowak και συν. 2000).

Η συμβολή της αφής στην ανεύρεση των θηλών από τα νεογέννητα αρνιά

Πέραν των άλλων αισθήσεων, τα νεογέννητα αρνιά βασίζονται και στην επαφή τους με τις μητέρες τους. Συγκεκριμένα χρησιμοποιούν την επαφή του άνω χείλους τους με το σώμα της, για να εντοπίσουν τις θηλές της (Vince, Ward & Reader 1984). Άλλωστε, σε αρνιά με αναισθητοποιημένο άνω χείλος παρατηρήθηκε αδυναμία προσέγγισης της θηλής (Vince και συν. 1987). Οι Billing και Vince (1987β) ανέφεραν ότι τα νεογέννητα αρνιά μπορούσαν να χρησιμοποιήσουν την υφή και την ελαστικότητα του δέρματος των μητέρων τους για τον εντοπισμό των θηλών της. Επιπρόσθετα, οι ίδιοι ερευνητές ανέφεραν ότι τα νεογέννητα αρνιά χρησιμοποιούσαν και την θερμοκρασία του δέρματος για τον εντοπισμό των θηλών, δείχνοντας ιδιαίτερη προτίμηση σε επιφάνειες των οποίων η θερμοκρασία ήταν πλησιέστερα στη θερμοκρασία του μαστού (Vince 1984).

Άλλα πρότυπα συμπεριφοράς προβατίνων και αρνιών

Άλλα πρότυπα συμπεριφοράς αμέσως μετά τον τοκετό

Πρότυπα συμπεριφοράς των νεογέννητων αρνιών

Αμέσως μετά τον τοκετό, τα νεογέννητα βρίσκονται σε κατάσταση διέγερσης ως συνέπεια της όλης διαδικασίας. Αυτή η κατάσταση ευνοεί την εξερεύνηση του σώματος της μητέρας, φέρνοντας έτσι τα νεογέννητα αρνιά σε επαφή με τις μητέρες τους και υποβοηθώντας τον εντοπισμό των θηλών (Nowak και συν. 2000). Η ανέγερση και ο επιτυχής θηλασμός των αρνιών σε σύντομο χρονικό διάστημα μετά τον τοκετό αποτελούν παράγοντες που συντελούν στη μείωση της νεογνικής θνησιμότητας στις εκτροφές. Αυτό δεν οφείλεται μόνο στα θεραπευτικά και ανοσολογικά οφέλη που αποκομίζουν τα αρνιά με τη γρήγορη λήψη πρωτογάλακτος, αλλά επίσης και στην ανάπτυξη σταθερού δεσμού μεταξύ των αρνιών και των προβατίνων (Dwyer, Dingwall & Lawrence 1999, Napolitano, Annicchiarico, Caroprese, De Rosa, Taibi & Sevi 2003, Val-Laillet, Simon & Nowak 2004). Φυσιολογικά, τα νεογέννητα αρνιά αρχίζουν αμέσως τις προσπάθειες ανέγερσής τους, κάτι που πετυχαίνουν σε 15 min έως 30 min μετά τη γέννησή τους (Smith 1965, Arnold & Morgan 1975, Gonyou & Stookey 1987).

Οι πρώτες ενέργειες των νεογέννητων μόλις σηκωθούν, είναι η αναζήτηση των θηλών και η απόπειρα θηλασμού. Με τις συνεχείς προσπάθειες των νεογέννητων, ο θηλασμός και η λήψη πρωτογάλακτος επιτυγχάνονται το πολύ εντός 60 min. Η χορήγηση πρωτογάλακτος στο αρνί λειτουργεί ως "επιβράβυσή" του, εγκαθιστώντας έτσι την προτίμηση κάθε αρνιού σε

συγκεκριμένη προβατίνα (Goursaud & Nowak 1999). Η συμπεριφορά των νεογέννητων αρνιών την πρώτη ημέρα της ζωής τους είναι αξιοσημείωτη. Τα αρνιά εκδηλώνουν προτίμηση θηλασμού μόνο στη συγκεκριμένη προβατίνα, όπου πρώτα θήλασαν (Nowak 1995, Nowak, Breton & Mellot 2001). Μόλις δημιουργηθεί ο δεσμός προβατίνας - αρνιού, η παρεμπόδιση του θηλασμού δεν έχει πλέον καμία αρνητική επίδραση σε αυτόν (Alexander & Williams 1966, Poindron, Martin & Hooley 1979, Nowak, Murphy, Lindsay, Alster, Andersson & Uvnas-Moberg 1997, Orihuela, Suarez & Vazquez 2004).

Οι Gonzalez και Goddard (1998), ανέφεραν ότι η συμπληρωματική παροχή πρωτογάλακτος στα αρνιά, αν και μείωνε τον κίνδυνο υποθερμίας και νεογνικού θανάτου, ίσως είχε και κάποια αρνητική επίπτωση στη σωστή ανάπτυξη της σχέσης μεταξύ των προβατίνων και των αρνιών. Αντίθετα, οι Goursaud και Nowak (1999) βρήκαν ότι η συμπληρωματική παροχή πρωτογάλακτος είχε τα ίδια θετικά αποτελέσματα με έναν επιτυχημένο θηλασμό, εφόσον πραγματοποιείτο με παρουσία της μητέρας.

Τα αρνιά προσελκύονται από τις προβατίνες κυρίως από οπτικά και ηχητικά ερεθίσματα, έρχονται δε σε επαφή μαζί τους για πρώτη φορά συνηθέστερα στην περιοχή της κεφαλής, του θώρακα ή των πλευρών. Η αναζήτηση των θηλών γίνεται κυρίως με βάση οσφρητικά και ακπικά ερεθίσματα. Καθώς το πρόσωπο των αρνιών εφάπτεται στο σώμα της μητέρας τους, ενεργοποιείται η "στοματική εξερεύνηση" και ο προσανατολισμός των αρνιών. Όμως, η ένταση της αντίδρασης αυτής εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας, με την οποία έρχονται σε επαφή τα νεογέννητα. Συγκεκριμένα, τα αρνιά δείχνουν προτίμηση σε ζεστές, απαλές, άτριχες, ελαστικές περιοχές, όπως ο μαστός (Vince 1984, Billing & Vince 1987α, β). Μάλιστα, όταν τα νεογέννητα προσεγγίζουν το μαστό, οι προβατίνες στέκονται ακίνητες με τα πίσω άκρα σε έκταση, ώστε να γίνει πιο εύκολη η εντόπιση των θηλών. Συχνά επίσης "καθοδηγούν" τα αρνιά, σπρώχνοντας με το κεφάλι τους το πίσω μέρος του σώματος του αρνιού (Sharafeldin & Kandeel 1971, McGlone & Stobart 1986, Nowak και συν. 2000).

Παράγοντες που επηρεάζουν τα πρότυπα συμπεριφοράς των νεογέννητων αρνιών

Η ανάπτυξη της φυσιολογικής νεογνικής συμπεριφοράς επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, οι οποίοι αφορούν στις προβατίνες και στα νεογέννητα. Το μεσοδιάστημα γέννησης - πρώτου θηλασμού κυμαίνεται από 20 min έως 60 min, ποικίλει δε μεταξύ των διαφόρων φυλών (Slee & Springbett 1986, Fahmy και συν. 1997, Cloete και συν. 2002, Dwyer 2003). Οι Dwyer και συν. (1996) παρατήρησαν ότι σε περιπτώσεις μεταφοράς εμβρύων, η φυλή της δότριας προβατίνας (και όχι της προβατίνας που κuoφόρησε), δηλαδή ο γενότυπος του ζώου, επηρέασε τη συμπεριφορά των νεογέννητων αρνιών.

Το μέγεθος της τοκετοομάδας και το φύλο των νεογέννητων παίζουν σαφή ρόλο στην εκδήλωση της συμπεριφοράς, δεδομένου ότι μονόδυμα αρνιά σηκώνονται και θηλάζουν πιο γρήγορα από δίδυμα, και αυτά με τη σειρά τους πιο γρήγορα από τρίδυμα (Arnold & Morgan 1975, O'Connor και συν. 1992, Cloete και συν. 2002). Οι Dwyer και Laurence (1998) και οι Cloete και συν. (2002) ανέφεραν ότι αρσενικά αρνιά εκδήλωναν τη συμπεριφορά αυτή πιο αργά από θηλυκά.

Η εμπειρία της μητέρας επηρεάζει σημαντικά τη συμπεριφορά των νεογέννητων. Συγκεκριμένα, αρνιά από πρωτότοκες προβατίνες χρειάστηκαν περισσότερο χρόνο για να σηκωθούν και να θηλάσουν, σε σχέση με αρνιά από πολύτοκες προβατίνες (O'Connor και συν. 1992, Dwyer 2003).

Άλλος παράγοντας που επηρέαζε την ικανότητα εκδήλωσης αυτής της συμπεριφοράς, ήταν η διατροφή των προβατίνων κατά την κυοφορία. Όπως είναι γνωστό, η ανεπαρκής διατροφή των εγκύων, ιδιαίτερα στο τελευταίο τρίτο της κύησης, οδηγεί σε γέννηση ελλιποβαρών αρνιών (Menzies 1997), τα οποία καθυστερούν να σηκωθούν και να θηλάσουν σε σχέση με φυσιολογικά αρνιά. Ίδια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και σε περίπτωση μεγάλης απώλειας βάρους της εγκύου (Nowak 1996, Dwyer 2003, Dwyer και συν. 2005). Όμως, και η υπερσίτιση των εγκύων οδηγεί σε υπέρβαρα έμβρυα, οπότε υπάρχει δυστοκία λόγω εμβρυομητρικής δυσαναλογίας. Αποτέλεσμα είναι ο συχνότερος τραυματισμός νευρικών ιστών ή η υποξία, με τελική συνέπεια την αργή και ατελή εκδήλωση αυτής της συμπεριφοράς (Dwyer 2003). Οι καιρικές συνθήκες είναι σημαντικές, διότι σε χαμηλή θερμοκρασία, υψηλή υγρασία και έντονο άνεμο, αυξάνεται η νεογνική θνησιμότητα των αρνιών, εξαιτίας της αδυναμίας τους να σηκωθούν και να θηλάσουν (Arnold & Morgan 1975, Bareham 1976, Nowak 1996) (Εικόνα 1.1).

Ακόμα και τα παραγωγικά χαρακτηριστικά μίας φυλής, όπως η εριοπαραγωγή ή η κρεοπαραγωγή, φαίνεται ότι επηρεάζουν το μεσοδιάστημα γέννησης - πρώτου θηλασμού. Για παράδειγμα, οι Kuchel και Lindsay (1999) ανέφεραν ότι σε πρόβατα εριοπαραγωγικών φυλών με άριστη ποιότητα ερίου, το μεσοδιάστημα αυτό ήταν περισσότερο αυξημένο σε σχέση με ζώα της ίδιας φυλής με μέση ποιότητα ερίου. Οι Dwyer, Lawrence και Bishop (2001) παρατήρησαν ότι η αυξημένη ποσότητα λίπους σε νεογέννητα αρνιά επηρέαζε αρνητικά το χρόνο φυσιολογικής εκδήλωσης αυτής της συμπεριφοράς.

Πρότυπα συμπεριφοράς της μητέρας

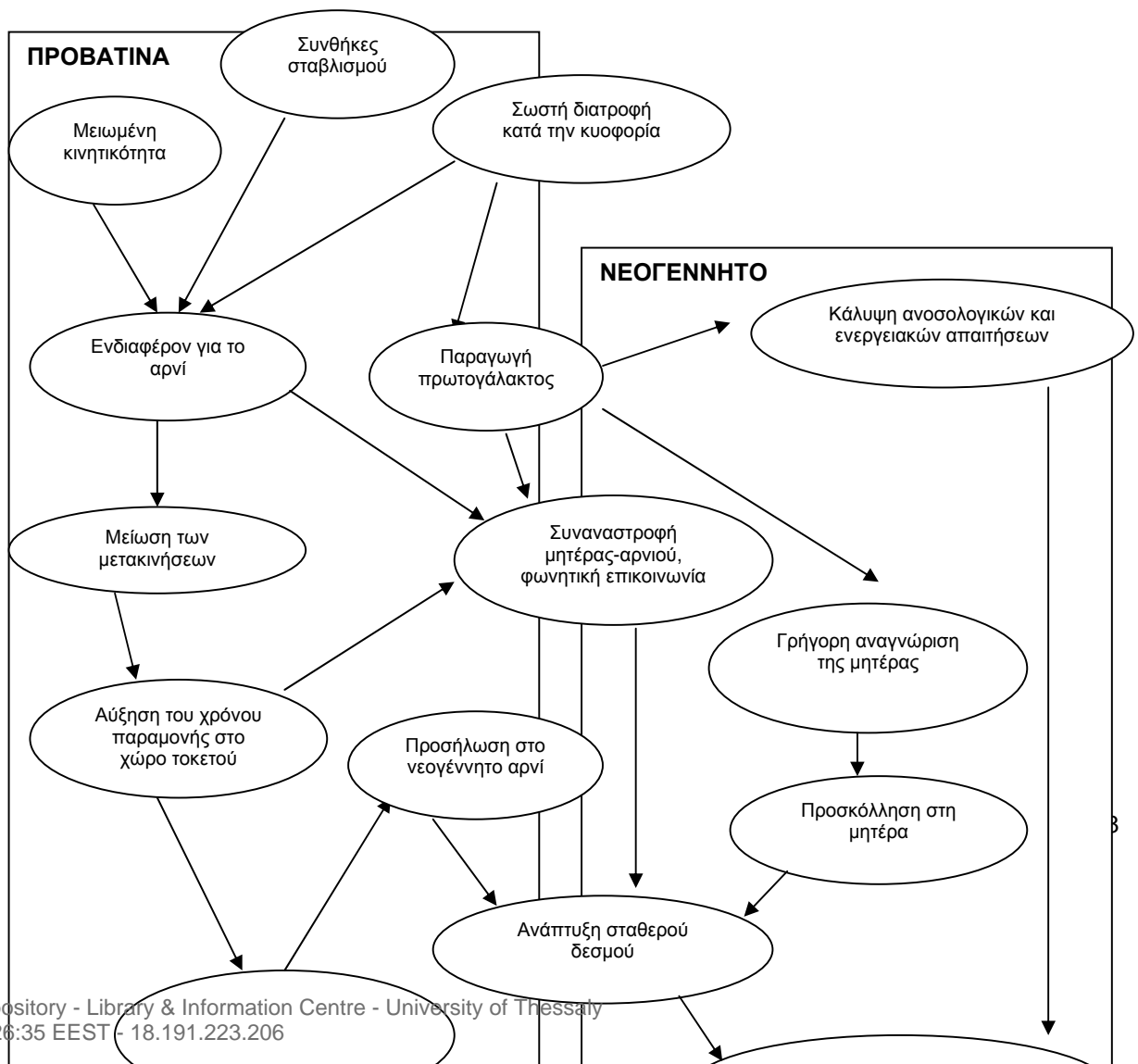
Αμέσως μετά τον τοκετό, στις προβατίνες (ιδιαίτερα στις πρωτότοκες) παρατηρείται έντονη κινητικότητα: κινήσεις προς τα εμπρός, κινήσεις προς τα πίσω ή κυκλικές κινήσεις γύρω

από τα νεογνά, καθώς αυτά προσπαθούν να θηλάσουν (Dwyer & Lawrence 1998). Η συχνότητά τους ποικίλλει μεταξύ των διαφόρων φυλών προβάτων.

Οι κυκλικές κινήσεις ερμηνεύονται ως προσπάθειες, ιδιαίτερα των άπειρων προβατίνων, να συνεχίσουν την επιμέλεια των νεογέννητων (Sharafeldin & Kandeel 1971). Σημειώνεται ότι τα αρνιά συνήθως ξεκινούν τις προσπάθειες θηλασμού από την κεφαλή των προβατίνων και με "οδηγό" το σώμα τους, καταλήγουν στη θηλή (McGlone & Stobart 1986, Vince 1992). Έτσι, αυτές οι κυκλικές κινήσεις μπορούν να θεωρηθούν και ως υποβοήθηση των προβατίνων στα νεογέννητα σε περιπτώσεις αποτυχίας του θηλασμού, δεδομένου ότι με αυτόν τον τρόπο τα αρνιά επιστρέφουν στην κεφαλή των προβατίνων και μπορούν να ξεκινήσουν νέα προσπάθεια θηλασμού (O'Connor και συν. 1992).

Αντίθετα, οι κινήσεις προς τα εμπρός ή προς τα πίσω θεωρούνται ως εκδηλώσεις αρνητικής συμπεριφοράς. Αυτές δε σχετίζονται με την περιποίηση των νεογέννητων, αλλά μάλλον τα απομακρύνουν από τη μητέρα τους (Dwyer & Lawrence 1998).

Εικόνα 1.1. Αλληλεπιδράσεις συμπεριφοράς και περιβάλλοντος στην επιβίωση των νεογέννητων αρνιών (τροποποιημένο από Nowak 1996)



Άλλα πρότυπα συμπεριφοράς κατά τη γαλακτική περίοδο

Τα αρνιά δε θηλάζουν συνεχώς, αλλά διακόπτουν για κάποια δευτερόλεπτα συνεχίζοντας από την ίδια ή την άλλη πλευρά (Ewbank 1964). Αυτό επαναλαμβάνεται πολλές φορές, έτσι ένα "επεισόδιο θηλασμού" (sucking bout) περιλαμβάνει περισσότερους από έναν επιμέρους θηλασμούς, που απέχουν μεταξύ τους μόνο λίγα δευτερόλεπτα. Έως τη δεύτερη εβδομάδα της ζωής τους, τα αρνιά συνήθως θηλάζουν οποιαδήποτε στιγμή και για όσο χρόνο επιθυμούν (Ewbank & Mason 1967). Στη συνέχεια όμως, οι προβατίνες απομακρύνονται από τα αρνιά τους σε συγκεκριμένες στιγμές, διακόπτοντας έτσι το θηλασμό.

Σε δίδυμες τοκετομάδες, η έναρξη των επεισοδίων θηλασμού συχνά καθορίζεται από τη μητέρα. Συνήθως μετά την 3η εβδομάδα, οι προβατίνες δεν επιτρέπουν το θηλασμό, παρά μόνον όταν και τα δύο αρνιά είναι παρόντα (Hinch 1989, Gordon & Siegmann 1991). Αντίθετα σε μονόδυμες τοκετομάδες, η έναρξη των επεισοδίων θηλασμού καθορίζεται συνήθως από τα ίδια τα αρνιά. Στα αρχικά στάδια της γαλακτικής περιόδου τα επεισόδια θηλασμού συνήθως τερματίζονται, καθώς η μητέρα κινείται εμπρός ή πίσω.

Μετά την 6η εβδομάδα, παρατηρείται σημαντική αύξηση της συχνότητας τερματισμού των επεισοδίων θηλασμού από τα ίδια τα αρνιά, προφανώς λόγω μείωσης της διαθέσιμης ποσότητας γάλακτος και των αυξημένων αναγκών των αρνιών, τα οποία πλέον καταναλώνουν και ποσότητες στερεάς τροφής (Hinch 1989). Επιπλέον, από την ηλικία αυτή τα περισσότερα αρνιά προοδευτικά απομακρύνονται από τη μητέρα τους (Ewbank & Mason 1967), εξαρτώμενα πλέον λιγότερο από αυτήν για τη διατροφή τους.

Σε μονόδυμα αρνιά φυλής Merino, οι Gordon και Siegmann (1991) παρατήρησαν ότι τα αρνιά θηλάζαν και από τους δύο μαστικούς αδένες, εναλλάσσοντάς τους κάθε 10 s έως 20 s. Η συχνότητα των θηλασμών μειωνόταν σταδιακά από 36 επεισόδια θηλασμού καθημερινά τις πρώτες δύο εβδομάδες σε 14 επεισόδια καθημερινά μετά την 6η εβδομάδα. Κατά τη διάρκεια της νύχτας παρατηρήθηκαν λιγότερα επεισόδια θηλασμού (1,2 και 0,5, αντίστοιχα) απ' ό,τι κατά τη διάρκεια της ημέρας (1,7 και 0,6, αντίστοιχα). Ανάλογα μειώθηκε και η διάρκεια των

επεισοδίων θηλασμού: από 41 s στην αρχή της γαλακτικής περιόδου σε 12 s στο τέλος της. Ανάλογα αποτελέσματα σε άλλες φυλές αναφέρθηκαν από τους Ewbank και Mason (1967), τους Hess, Graves και Wilson (1974) και το Hinch (1989). Προφανώς, αυτή η μείωση της συχνότητας και της διάρκειας των επεισοδίων θηλασμού παρατηρείται καθώς τα αρνιά προοδευτικά αυξάνουν την κατανάλωση στερεάς τροφής (Rattray 1992, Haenlein 2001), ενώ ταυτόχρονα μειώνεται και η ποσότητα του διαθέσιμου γάλακτος (Haenlein 2001, Haenlein & Abdellatif 2004). Τα ευρήματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με τις παρατηρήσεις σχετικά τον καθορισμό της λήξης των επεισοδίων θηλασμού από τα ίδια τα αρνιά, όπως αναφέρθηκε παραπάνω.

Όσον αφορά στη συχνότητα θηλασμού σε πολύδυμα αρνιά, τα στοιχεία είναι αντιφατικά. Αφενός, ο Ewbank (1964) και ο Hinch (1989) ανέφεραν ότι σε δίδυμα ή τρίδυμα αρνιά, η συχνότητα των επεισοδίων θηλασμών αυξανόταν με το μέγεθος της τοκετοομάδας, αλλά η διάρκεια θηλασμού τους ήταν μικρότερη από αυτήν μονόδυμων αρνιών (Πίνακας I.i). Αφετέρου, οι Hess και συν. (1974) ανέφεραν ότι τρίδυμα αρνιά θήλαζαν λιγότερο συχνά και για μικρότερη διάρκεια από δίδυμα ή μονόδυμα.

Πίνακας I.i. Στοιχεία συμπεριφοράς αρνιών σε τοκετοομάδες διαφόρου μεγέθους (Hinch 1989).

Ηθολογική παράμετρος	Μονόδυμα	Δίδυμα	Τρίδυμα
Συχνότητα θηλασμού (επεισόδια / h)	0.32	0.40	0.44
Μέση διάρκεια επεισοδίων θηλασμού (s)	13.1	11.5	10.2
Αναλογία (%) επεισοδίων θηλασμού, η έναρξη των οποίων καθορίστηκε από τα αρνιά	94.7	88.3	91.2
Αναλογία (%) επεισοδίων θηλασμού, ο τερματισμός των οποίων καθορίστηκε από τα αρνιά	3.6	6.1	8.9
Συχνότητα αποτυχημένων προσπαθειών θηλασμού (απόπειρες / h)	0.09	0.11	0.30

Η συχνότητα θηλασμού επηρεάζεται σημαντικά από τη φυλή των προβατίνων (Dwyer & Lawrence 1999). Σε προβατίνες φυλής Suffolk έγιναν περισσότερες προσπάθειες θηλασμού απ' ό,τι σε προβατίνες φυλής Scottish-Blackface, ακόμη και όταν αυτές γέννησαν αρνιά μετά από μεταφορά εμβρύων (δηλαδή από προβατίνες άλλης φυλής). Αρνιά πρωτότοκων προβατίνων θήλαζαν πιο συχνά απ' ό,τι αρνιά πολύτοκων ζώων (Dwyer 2003). Το βάρος των αρνιών πιθανόν αποτελεί παράγοντα που σχετίζεται με τη συχνότητα του θηλασμού: τα ελαφρύτερα αρνιά θήλαζαν πιο συχνά (Ewbank & Mason 1967, Slee & Springbett 1986). Τέλος, η σταδιακή μείωση της ποσότητας του γάλακτος κατά την εξέλιξη της γαλακτικής περιόδου, οδηγεί και σε μείωση της συχνότητας και της διάρκειας του θηλασμού (Hinch 1989).

Όσον αφορά στην προτίμηση για θηλασμό ενός συγκεκριμένου μαστικού αδένος, οι Hess και συν. (1974) δεν κατέγραψαν καμία ιδιαίτερη προτίμηση κατά τη διάρκεια των ερευνών τους.

Αντίθετα, ο Ewbank (1964) ανέφερε ότι από το μέσον της γαλακτικής περιόδου, η πλειονότητα των δίδυμων αρνιών εκδήλωναν σταθερή προτίμηση σε συγκεκριμένο μαστικό αδέν. Όμως σε επόμενη μελέτη (Ewbank 1967), ανέφερε ότι σε περίπτωση απομάκρυνσης ενός από δίδυμα αρνιά από τη μητέρα του, το δεύτερο αρνί δεν έδειχνε πλέον προτίμηση σε συγκεκριμένο αδέν.

Νευρο-ενδοκρινική ρύθμιση της μητρικής συμπεριφοράς

Στις προβατίνες δύο κύριοι παράγοντες δρουν συνεργικά για την εκδήλωση της μητρικής συμπεριφοράς: α) η οιστραδιόλη και β) ο ερεθισμός του τραχήλου και του κόλπου κατά τον τοκετό (Poindron και συν. 1988, Broad, Levy, Evans, Kimura, Keverne & Kendrick 1999, Dwyer, Gilbert & Lawrence 2004).

Η έκκριση της οιστραδιόλης αυξάνεται στο τέλος της εγκυμοσύνης, με τη μεγαλύτερη συγκέντρωσή της 24 h πριν από τον τοκετό. Η δίοδος του εμβρύου από τη γεννητική οδό προκαλεί τον ερεθισμό του τραχήλου και του κόλπου και τη συνακόλουθη έκλυση ωκυτοκίνης (αντανακλαστικό του Ferguson). Η ωκυτοκίνη ενισχύει τις συσπάσεις της μήτρας, καθώς και την περαιτέρω σύνθεσή της στον υποθάλαμο, οπότε με τη σειρά της ενεργοποιεί τη μητρική συμπεριφορά.

Αυτοί οι δύο παράγοντες, εφόσον δρουν χωριστά, δεν προκαλούν το συνεργικό αποτέλεσμα, όπως αποδείχθηκε σε προσπάθειες για την εκδήλωση της μητρικής συμπεριφοράς σε μη έγκυες προβατίνες (Poindron, Rempel, Troyer & Krehbiel 1989, Kendrick & Keverne 1991, Kendrick, Keverne, Hinton & Goode 1991). Όμως, η συνεργική δράση τους προκαλεί πάντα άμεση εκδήλωση της μητρικής συμπεριφοράς. Η αυξημένη συγκέντρωση οιστραδιόλης πριν από τον τοκετό προετοιμάζει το νευρικό σύστημα για τη σύνθεση ωκυτοκίνης και των υποδοχέων της, μετά τον ερεθισμό του τραχήλου και του κόλπου. Η ακριβής επίδραση της οιστραδιόλης στο κεντρικό νευρικό σύστημα δεν έχει εξακριβωθεί, αν και οι Dwyer και συν. (2004) ανέφεραν ότι η οιστραδιόλη μάλλον ρύθμιζε τα ιδιαίτερα ατομικά χαρακτηριστικά μητρικής συμπεριφοράς σε κάθε προβατίνα.

Σε έρευνες στους νευρώνες με υποδοχείς οιστρογόνων, παρατηρήθηκε αυξημένη λειτουργικότητά τους λίγες ημέρες πριν από τον τοκετό, ειδικότερα δε στους πυρήνες του υποθαλάμου (παρακοιλιακός πυρήνας, υπεροπτικός πυρήνας, αμυγδαλοειδής πυρήνας), που σχετίζονται με τη σύνθεση και την έκκριση ωκυτοκίνης (Poindron 2005). Όμως σε πρωτότοκες (δηλαδή άπειρες προβατίνες), οι Meurisse, Gonzaez, Delsol, Caba, Levy & Poindron (2005)

βρήκαν ότι η λειτουργία αυτών των υποδοχέων στις ίδιες εγκεφαλικές δομές ήταν σχετικά μειωμένη.

Η ενδοεγκεφαλική έγχυση ωκυτοκίνης είχε ως αποτέλεσμα την έναρξη μητρικής συμπεριφοράς, συμπεριλαμβανομένης της παραγωγής ήχων χαμηλής έντασης, υποδηλώνοντας ότι η φωνητική αυτή μητρική συμπεριφορά ρυθμίζεται από την ωκυτοκίνη. Επιπλέον, η εμφάνιση των ήχων χαμηλής έντασης σε σχέση με το χρόνο συμβαδίζει με τις αλλαγές της συγκέντρωσης της ωκυτοκίνης στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό κατά τη διάρκεια της περιτοκιαίας περιόδου (Kendrick & Keverne 1991).

Εκτός όμως τους δύο αυτούς, και άλλοι κεντρικοί και περιφερικοί παράγοντες συμμετέχουν στην ενεργοποίηση της μητρικής συμπεριφοράς κατά τον τοκετό. Για παράδειγμα, η μείωση της συγκέντρωσης προγεστερόνης στο αίμα διευκολύνει την επίδραση του ερεθισμού του τραχήλου και του κόλπου (Kendrick & Keverne 1991). Επιπλέον, οι Keverne και Kendrick (1991) ανέφεραν ότι οι χαμηλής έντασης ήχοι σε προβατίνες που είχαν γεννήσει, ενεργοποιούνταν από τη χορήγηση οπιοειδών, ενώ επιπλέον οι Caba, Poindron, Krehbiel, Levy, Romeyer και Venier (1995) βρήκαν ότι η χορήγηση ανταγωνιστών των οπιοειδών (για παράδειγμα: ναλτρεξόνης) μπορούσε να τους ελαττώσει. Σε αντίθεση με τα παραπάνω, αν και η συγκέντρωση της προλακτίνης αυξάνεται τις τελευταίες τέσσερις εβδομάδες πριν τον τοκετό και παραμένει υψηλή κατά τη διάρκεια της γαλουχίας, η ορμόνη αυτή δε φαίνεται ότι συμμετέχει σημαντικά στην εκδήλωση της μητρικής συμπεριφοράς στις προβατίνες (Poindron, Orgeur, Le Neindre, Kann & Raksanyi 1980, Kendrick και συν. 1997, Poindron 2005).

Υπό την επίδραση όλων αυτών των παραγόντων, πιθανόν δε και άλλων που δεν έχουν ακόμη αναγνωριστεί, η πρώτη εκδήλωση μητρικής συμπεριφοράς παρουσιάζεται 3 h έως 4 h πριν από τον τοκετό, κορυφώνεται δε αμέσως μετά από αυτόν. Όμως, η διατήρηση αυτής της συμπεριφοράς εξαρτάται από την ενασχόληση της μητέρας με τα νεογέννητα.

Σε προβατίνες, στις οποίες δεν επιτράπηκε η επαφή με τα νεογέννητά τους, η μητρική συμπεριφορά μειώθηκε ραγδαία (Alexander, Stevens, Kilgour, de Langen, Motterhead & Lynch 1983). Ακόμη και 24 h μετά τον τοκετό οι περισσότερες από αυτές (>75%) δεν μπόρεσαν να επιδείξουν μητρική φροντίδα, ακόμη και όταν ήρθαν πάλι σε επαφή με τα νεογέννητά τους (Smith, Van-Toller & Boyes 1966, Levy, Gervais, Kindermann, Litterio, Poindron & Porter 1991, Poindron και συν. 1993). Αυτή θεωρείται ως "κρίσιμη" περίοδος για την ανάπτυξη δεσμού μεταξύ μητέρων και νεογέννητων, καθώς εάν ο αποχωρισμός λάβει χώρα 24 h μετά τον τοκετό, οι περισσότερες προβατίνες αναγνωρίζουν τα νεογέννητά τους και τα αποδέχονται, μόλις επιστρέψουν σε αυτές (Poindron & Le Neindre 1980). Αυτή ακριβώς η εμπειρία που

αποκομίζουν οι προβατίνες από την πρώιμη συναναστροφή τους με τα νεογέννητα, είναι απόλυτα απαραίτητα για την εδραίωση του μεταξύ τους δεσμού.

Σε αυτήν την "κρίσιμη" περίοδο η ρύθμιση της μητρικής συμπεριφοράς μεταβάλλεται: από νευρο-ενδοκρινική γίνεται νευρο-αισθητηριακή, καθώς αρχίζει η επίδραση των οσφρητικών δεδομένων (Hernez, Serafin, Terrazas, Marnet, Kann, Delgadillo & Poindron 2002). Με την πάροδο 60 min έως 120 min από τον τοκετό και την πρώτη επαφή τους με τα νεογέννητα, οι προβατίνες απομνημονεύουν πλέον τα ιδιαίτερα οσφρητικά χαρακτηριστικά των αρνιών τους και έτσι τα αναγνωρίζουν, τα αποδέχονται και πλέον επιμελούνται μόνον αυτά (Poindron & Le Neindre 1980). Η απομνημόνευση των οσφρητικών χαρακτηριστικών ελέγχεται μέσω της παραγωγής ορισμένων νευροδιαβιβαστών. Κατά τον τοκετό, νοραδρεναλίνη, ακετυλοχολίνη και ωκυτοκίνη εκκρίνονται στους οσφρητικούς βολβούς των προβατίνων, συμμετέχοντας στην απομνημόνευση της χαρακτηριστικής οσμής των νεογέννητων (Pissonnier, Thiery, Fabre-Nys, Poindron & Keverne 1985, Kendrick 2000).

Σε νεότερες μελέτες βρέθηκε ότι η απομνημόνευση αυτή αφορά και σε οπτικά και ακουστικά ερεθίσματα από τα αρνιά, ήδη 6 h μετά τον τοκετό (Keller και συν. 2003, Poindron και συν. 2003). Όμως διαδικασία απομνημόνευσης μέσω νευροδιαβιβαστών δεν έχει ακόμη αναφερθεί στο σύστημα της όρασης και της ακοής (Poindron 2005).

Όπως κατ' επανάληψη αναφέρθηκε παραπάνω, η μητρική συμπεριφορά και ιδιαίτερα ο βαθμός εκδήλωσής της, επηρεάζεται από την εμπειρία των προβατίνων. Σε πολύτοκες προβατίνες, βρέθηκε ότι ο αριθμός των υποδοχέων οιστρογόνων και ωκυτοκίνης στους πυρήνες του υποθαλάμου ήταν σημαντικά μεγαλύτερος απ' ό,τι σε άπειρες προβατίνες (Broad και συν. 1999, Meurisse και συν. 2005). Έτσι, πιθανόν εξηγείται η ανεπαρκής μητρική συμπεριφορά των πρωτότοκων, άπειρων προβατίνων, καθώς και η καθυστέρηση στην εκδήλωσή της. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι στους οσφρητικούς βολβούς πολύτοκων προβατίνων παρατηρείται εντονότερη απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών, καθώς και μεγαλύτερη ευαισθητοποίηση στην ωκυτοκίνη (Levy, Guevara-Guzman, Hinton, Kendrick & Keverne 1993, Levy, Kendrick, Goode, Guevara-Guzman & Keverne 1995). Αυτή η διαφορά ίσως συμβάλλει περαιτέρω στις παρατηρούμενες διαφορές μεταξύ πρωτότοκων - πολύτοκων ζώων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ

ΠΡΟΤΥΠΑ ΜΗΤΡΙΚΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΘΗΛΑΣΜΟΥ ΣΕ ΠΡΟΒΑΤΑ ΚΑΡΑΓΚΟΥΝΙΚΗΣ ΦΥΛΗΣ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η περίοδος αμέσως μετά τον τοκετό είναι ιδιαίτερα σημαντική για την επιβίωση των νεογέννητων αρνιών (Nowak & Poindron 2006). Η συμπεριφορά της προβατίνας και του(ων) νεογέννητου(ων) της επηρεάζει την επιβίωση και την ανάπτυξη του(ων) αρνιού(ών) και συνεπώς, η αρμονική και συντονισμένη ανάπτυξη της μεταξύ τους σχέσης είναι απαραίτητη. Στη διεθνή βιβλιογραφία, έχει περιγραφεί εκτενώς η φυσιολογική συμπεριφορά της προβατίνας και των νεογέννητων κατά την περίοδο του θηλασμού. Επιπλέον, έχουν ταυτοποιηθεί παράγοντες που επηρεάζουν αυτή τη συμπεριφορά (Dwyer και συν. 1999). Όμως οι μελέτες αυτές έχουν πραγματοποιηθεί αποκλειστικά σε πρόβατα κρεοπαραγωγικών φυλών.

Από κάποιους ερευνητές έχει αναφερθεί ότι προβατίνες γαλακτοπαραγωγικών φυλών δεν είχαν τόσο "καλή" μητρική συμπεριφορά όσο ζώα κρεοπαραγωγικών φυλών (Rattray 1992, Margetin, Capistak, Kica, Valkovsky & Foltys 1994). Άλλωστε, σε προηγούμενες μελέτες βρέθηκε ότι η μητρική συμπεριφορά των προβατίνων ορεινών φυλών (στις οποίες δεν είχε λάβει χώρα εκτενής γενετική βελτίωση) ήταν καλύτερη από αυτήν προβατίνων πεδινών φυλών (Shillito-Walser και συν. 1984, Dwyer και Lawrence 1998, Dwyer και συν. 1999), δηλαδή ζώων με έντονη γενετική βελτίωση, όπως οι προβατίνες γαλακτοπαραγωγικών φυλών. Ωστόσο, δεν υπάρχουν αναφορές σχετικά με τη συμπεριφορά του θηλασμού σε προβατίνες γαλακτοπαραγωγικών φυλών.

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφονται τα πρότυπα φυσιολογικής συμπεριφοράς θηλασμού προβατίνων και αρνιών Καραγκούνικης φυλής, η οποία είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη φυλή προβάτων στην Ελλάδα. Επιπλέον, η φυλή έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε πρόσφατη ερευνητική δραστηριότητα που αφορά στη μαστίτιδα (π.χ. Saratsis, Alexopoulos, Tzora & Fthenakis 1999, Mavrogianni, Fthenakis, Brooks, Papaioannou, Cripps, Taitzoglou, Brellou & Saratsis 2005). Συνεπώς αποτελεί αντιπροσωπευτική φυλή για τη μελέτη της συμπεριφοράς θηλασμού και για την περιγραφή των προτύπων συμπεριφοράς στις γαλακτοπαραγωγικές φυλές προβάτων.

Τα δεδομένα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν, ώστε: i. να συγκριθούν με ανάλογα βιβλιογραφικά δεδομένα που αφορούν στις κρεοπαραγωγικές φυλές προβάτων, ii. να εκτιμηθεί η πιθανή συσχέτιση των προτύπων συμπεριφοράς θηλασμού με την υγεία του μαστικού αδένος και iii. να μελετηθούν πιθανές μεταβολές τους σε περίπτωση μαστίτιδας.

B. ΠΡΟΤΥΠΑ ΜΗΤΡΙΚΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΘΗΛΑΣΜΟΥ

Υλικά και μέθοδοι

Πειραματικός σχεδιασμός

Στον πειραματισμό αυτό χρησιμοποιήθηκαν 12 πολύτοκες προβατίνες Καραγκούνικης φυλής. Ο πειραματισμός πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις της Κλινικής, με βάση σχετική άδεια από τη Διεύθυνση Κτηνιατρικής της Νομαρχιακής Αυτοδιοίκησης Καρδίτσας.

Δύο εβδομάδες πριν τον αναμενόμενο τοκετό τους, τα ζώα μεταφέρθηκαν σε ατομικούς χώρους σταυλισμού καλυμμένους με αχυροστρωμένη (1,8 m X 5,0 m). Στους χώρους αυτούς, ήταν δυνατή η οπτική επαφή μεταξύ δύο γειτονικών προβατίνων. Στις προβατίνες χορηγούνταν δύο φορές καθημερινά 600 g συμπυκνωμένης τροφής, καθώς και άριστης ποιότητας σανός κατά βούληση.

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

Οι προβατίνες γέννησαν φυσιολογικά (δηλαδή χωρίς να απαιτηθεί μαιευτική βοήθεια) το Φεβρουάριο ή το Μάρτιο 2005. Έξι από αυτές γέννησαν ένα αρνί και οι άλλες έξι γέννησαν δύο. Κάθε προβατίνα σημαίνονταν με χρωματιστό αριθμό στη ράχη της, ώστε να διευκολυνθεί η ταυτοποίησή της κατά την παρακολούθηση των καταγραφών συμπεριφοράς. Ομοίως, τα δίδυμα αρνιά σημαίνονταν με χαρακτηριστικά χρωματιστά σημάδια, ώστε να είναι εύκολη η μετέπειτα ταυτοποίησή τους. Τα χρωματιστά αυτά σημάδια τονίζονταν δύο φορές κάθε εβδομάδα.

Η διάρκεια του πειραματισμού ήταν 42 ημέρες μετά τον τοκετό. Στο διάστημα αυτό πραγματοποιείτο κλινική εξέταση των ζώων, γινόταν συλλογή υλικού θηλαίου πόρου και γάλακτος από τις προβατίνες για βακτηριολογική και κυτταρολογική εξέταση και καταγράφονταν η συμπεριφορά των ζώων.

Κλινική εξέταση - Δειγματοληψίες

Κλινική εξέταση

Η πρώτη εξέταση και η πρώτη δειγματοληψία πραγματοποιήθηκαν αμέσως μετά τον τοκετό (D0). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν άλλες 19 εξετάσεις και δειγματοληψίες από κάθε προβατίνα. Συγκεκριμένα, δειγματοληψίες πραγματοποιούνταν καθημερινά από την D1 (δηλαδή την πρώτη ημέρα μετά τον τοκετό) έως την D5, κάθε δύο ημέρες από την D6 έως την D18, κάθε τρεις ημέρες από την D21 έως την D30 και κάθε τέσσερις ημέρες από την D34 έως την D42.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε γενική κλινική εξέταση του ζώου. Στη συνέχεια, εξετάστηκαν ειδικότερα οι μαστικοί αδένες και οι θηλές τους. Το ζώο καταρρίφθηκε και συγκρατήθηκε σε τέτοια θέση, ώστε η περινεϊκή χώρα του να ακουμπά στο δάπεδο και η ράχη του να στηρίζεται στα πόδια ενός βοηθού. Οι δύο μαστικοί αδένες παρατηρήθηκαν, ψηλαφήθηκαν και συγκρίθηκε ο ένας με τον άλλο. Το σχήμα τους, το μέγεθός τους, η θερμοκρασία τους και οποιοσδήποτε ανωμαλίες τους καταγράφηκαν. Μετά, ψηλαφήθηκαν τα επιχώρια λεμφογάγγλια.

Οι δύο θηλές παρατηρήθηκαν, ψηλαφήθηκαν και συγκρίθηκε η μία με την άλλη. Το μέγεθός τους, η θερμοκρασία τους, η υφή του τοιχώματός τους, η εμφάνιση του στομίου τους και οποιοσδήποτε ανωμαλίες καταγράφηκαν.

Δειγματοληψίες

Στη συνέχεια, λαμβάνονταν δείγματα υλικού θηλαίου πόρου χρησιμοποιώντας την τεχνική με στείρους, λεπτούς, πλαστικούς καθετήρες, που περιγράφηκε και αξιολογήθηκε από τους Μαυρογιάννη (2006) και Mavrogiani, Cripps και Fthenakis (2006). Η τεχνική συνίσταται στη χρησιμοποίηση στείρου, λεπτού, πλαστικού καθετήρα 20 G (Abbotcath®-Abbott Laboratories Inc., Abbott Park, ΗΠΑ), ο οποίος εισάγεται στο θηλαίο πόρο τής υπό εξέταση προβατίνας. Πριν την εισαγωγή του καθετήρα, αφαιρείτο ο μεταλλικός οδηγός - βελόνα και, στη συνέχεια, ο πλαστικός καθετήρας κοβόταν με στείρα λεπίδα χειρουργικού νυστεριού σε μήκος 2 mm. Για τον ακριβή προσδιορισμό του σημείου τομής, χρησιμοποιείτο πάντοτε αποστειρωμένος μεταλλικός χάρακας, που τοποθετείτο ακριβώς δίπλα στον καθετήρα. Η όλη διαδικασία πραγματοποιείτο επάνω σε αποστειρωμένη χειρουργική οθόνη, ο δε χειριστής φορούσε χειρουργικά γάντια. Στη συνέχεια γινόταν η δειγματοληψία. Με την προβατίνα συγκρατούμενη σε όρθια θέση, γινόταν αρχικά απολύμανση του στομίου και του κατώτερου τμήματος (1 cm) της θηλής με διάλυμα ιωδιούχου ποβιδόνης και στη συνέχεια έκπλυση με αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό. Ο καθετήρας συγκρατείτο από το ανώτερο ευρύ πλαστικό στόμιό του και εισαγόταν στο θηλαίο πόρο, στο εσωτερικό τοίχωμα του οποίου περιστρεφόταν, και στη συνέχεια αφαιρείτο.

Στη συνέχεια συλλέγονταν δείγματα γάλακτος. Οι δύο πρώτες ριπές γάλακτος συλλέγονταν πάνω στην παλάμη του δειγματολήπτη και εξετάζονταν για την ύπαρξη

παθολογικών χαρακτηριστικών. Ακολουθούσε η λήψη δείγματος γάλακτος σε στείρο φιαλίδιο (Sterilin Ltd, Stone, Ηνωμένο Βασίλειο) για εργαστηριακή εξέτασή του.

Σε κάθε περίπτωση εξετάζονταν και λαμβάνονταν δείγματα και από τις δύο θηλές και τους δύο μαστικούς αδένες κάθε ζώου.

Εργαστηριακές εξετάσεις

Όλα τα δείγματα υλικού θηλαίου πόρου (στην άκρη του πλαστικού καθετήρα) και τα δείγματα γάλακτος καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία με αιματούχο (5% πρόβειο αίμα) άγαρ Columbia (BioMerieux S.A., Marcy-l'-Etoile, Γαλλία), τα οποία επωάστηκαν σε αερόβιο περιβάλλον σε 37 °C έως 72 h. Η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών που αναπτύχθηκαν έγινε με τη χρήση καθιερωμένων βακτηριολογικών εξετάσεων (Barrow & Feltham 1993, Euzeby 1997) και τις ταχείες δοκιμές API (BioMerieux S.A., Marcy-l'-Etoile, Γαλλία).

Σε κάθε δείγμα γάλακτος πραγματοποιήθηκε η δοκιμή California Mastitis Test (CMT) (αντιδραστήριο Jorgen Kruuse A/S, Marslev, Δανία). Η δοκιμή συνίστατο στην ανάμιξη περίπου 2 mL μαστικού εκκρίματος με ίση ποσότητα αντιδραστηρίου (3% λαουρυλοθειικό νάτριο). Η ανάμιξη γινόταν με λήψη δείγματος γάλακτος σε κύπελλο (διάμετρος 7,5 cm, βάθος 2 cm) ειδικής συσκευής, μετά από τοποθέτησή της κάτω από τους μαστικούς αδένες του ζώου, άμεση πρόσθεση του αντιδραστηρίου και ανάμιξή τους με κυκλικές κινήσεις της συσκευής. Το αποτέλεσμα της αντίδρασης βαθμολογήθηκε με έναν από τους πέντε βαθμούς αντίδρασης: "αρνητικό", "ίχνη", "1", "2", "3", σύμφωνα με το πρότυπο που περιγράφεται στον Πίνακα II.i. Επιπλέον, παρασκευάζονταν επιχρίσματα από το γάλα για χρώση Giemsa (Merck KGaA, Darmstadt, Γερμανία).

Πίνακας II.i. Πρότυπο βαθμολογίας των αντιδράσεων στη δοκιμή CMT στο γάλα προβατίνων.

Βαθμολογία	Περιγραφή της αντίδρασης
Αρνητική Ίχνη	Απουσία αντίδρασης ή παρουσία μικρής αρχικής κοκκίωσης που διαλυόταν γρήγορα
1	Παρουσία μικρής κολλώδους μάζας, πιο ευκρινούς στο άκρο του κυπέλλου
2	Παρουσία μεγάλης κολλώδους μάζας, που δε συγκεντρωνόταν κατά την ανακίνηση του μίγματος
3	Παρουσία μεγάλης κολλώδους μάζας ή ημιστερεού πηγματος, που συγκεντρωνόταν

Μέτρηση παραγωγικών χαρακτηριστικών

Τα αρνιά ζυγίστηκαν αμέσως μετά τη γέννησή τους και στη συνέχεια σε εβδομαδιαία διαστήματα έως τον απογαλακτισμό τους σε ηλικία 42 ημερών (D42).

Η παραγωγή γάλακτος από τις προβατίνες μετρήθηκε αρχικά την D13 και στη συνέχεια σε εβδομαδιαία διαστήματα, εφαρμόζοντας την παρακάτω μέθοδο. Οι προβατίνες αποχωρίζονταν από τα αρνιά τους και γινόταν μία ενδομυϊκή ένεση ωκυτοκίνης (10 iu). Μετά από 5 min, οι προβατίνες αρμέγονταν έως πλήρη κένωση των μαστικών αδένων τους. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνονταν 4 h αργότερα, οπότε το γάλα από κάθε μαστικό αδένιο συλλέγονταν σε ογκομετρικό σωλήνα, προκειμένου να μετρηθεί ο όγκος του. Η συσχέτιση των αποτελεσμάτων της μεθόδου αυτής με τη συνολική καθημερινή παραγωγή γάλακτος σε προβατίνες έχει αξιολογηθεί από το Fthenakis (1988) και τους Fthenakis και Jones (1990α).

Παρατηρήσεις συμπεριφοράς

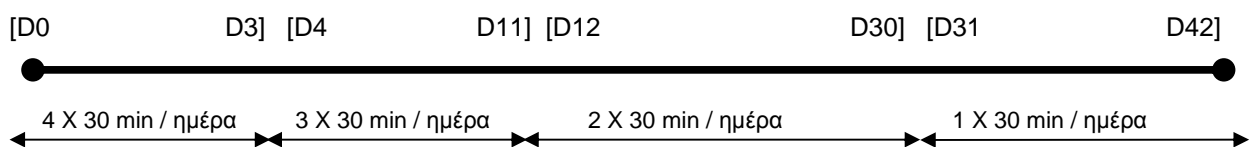
Οι καταγραφές της συμπεριφοράς έγιναν χωριστά για κάθε προβατίνα και το(α) αρνί(ιά) της με δύο ψηφιακούς καταγραφείς εικόνων (92E-Sony, Tokyo, Ιαπωνία), εφαρμόζοντας διαδικασία συνεχούς καταγραφής.

Αρχικά, η συμπεριφορά κάθε προβατίνας και του/των αρνιού/ών της καταγράφονταν χωρίς διακοπή τις δύο πρώτες ώρες μετά τη γέννηση (D0). Στη συνέχεια, η ημερήσια περίοδος παρακολούθησης ορίστηκε από 9.00 έως 21.00 και περιλάμβανε δίωρη απογευματινή διακοπή για τη φροντίδα των ζώων. Κατά την περίοδο παρακολούθησης, δεν επιτρεπόταν καμία είσοδος ατόμων στο χώρο σταυλισμού των ζώων. Τις ημέρες D1, D2 και D3 πραγματοποιήθηκαν τέσσερις περίοδοι καταγραφής καθημερινά, διάρκειας 30 min κάθε μία, με μεσοδιάστημα 30 min μεταξύ τους. Στη συνέχεια, το πρόγραμμα καταγραφής συμπεριφοράς ήταν ως εξής: από D4 έως D11 τρεις περίοδοι καταγραφής καθημερινά, διάρκειας 30 min κάθε μία, από D12 έως D30 δύο περίοδοι καταγραφής καθημερινά, διάρκειας 30 min κάθε μία, από D31 έως D42 μία περίοδος καταγραφής καθημερινά, διάρκειας 30 min (Εικόνα II.1). Από την D4 έως το τέλος του πειραματισμού, οι περίοδοι καταγραφής κατανέμονταν στην ημερήσια περίοδο παρακολούθησης τυχαία. Έτσι διασφαλίστηκε ότι οι καταγραφές κατανεμήθηκαν σε όλη την ημερήσια περίοδο παρακολούθησης στη διάρκεια του πειραματισμού. Ειδικά τις ημέρες D13,

D20, D27, D34, D41, δεν πραγματοποιήθηκαν καταγραφές. Δεδομένου ότι εκείνες τις ημέρες έγιναν μετρήσεις παραγωγής γάλακτος, θεωρήθηκε ότι η συμπεριφορά των ζώων δε θα ήταν φυσιολογική.

Οι παρατηρήσεις περιλάμβαναν την καταγραφή όλων των συμπεριφορών των προβατινών και των αρνιών τους. Ο ορισμός των συμπεριφορών που καταγράφηκαν και μελετήθηκαν ("ηθόγραμμα") παρουσιάζεται στον Πίνακα II.ii.

Εικόνα II.1. Γραμμικό χρονοδιάγραμμα των καταγραφών συμπεριφοράς σε κάθε προβατίνα.



Πίνακας II.ii. Ορισμός των συμπεριφορών που καταγράφηκαν και μελετήθηκαν ("ηθόγραμμα") στη διάρκεια του πειραματισμού.

Συμπεριφορές προβατινών	
Κατάκλιση (LD)	Η προβατίνα βρίσκεται σε κατάκλιση αδρανής ή μηρυκάζει
Όσφρηση / Επαφή με τη μύτη (SN)	Φέρνει τη μύτη σε επαφή με το αρνί, χωρίς όμως να το περιποιείται
Περιποίηση νεογέννητου (G)	Γλύφει και καθαρίζει το αρνί (περιλαμβάνεται και η κατανάλωση των εμβρυϊκών υμένων)
Απομάκρυνση (W)	Κινείται προς τα πίσω (>1 βήμα) απομακρυνόμενη από το αρνί όταν την πλησιάζει

Εγκατάλειψη / Απόρριψη (A/R)	Δεν περιποιείται το αρνί Ή εγκαταλείπει το αρνί αμέσως μετά τον τοκετό (απόσταση μεταξύ τους ≥ 1 μήκος σώματος) Ή απωθεί το αρνί όταν πλησιάζει
Απώθηση (B)	Απωθεί το αρνί προς τα κάτω ή μακριά της
Παρεμπόδιση θηλασμού (HC / HB / HF)	Κινείται καθώς το αρνί πλησιάζει την περιοχή του μαστού: κυκλική κίνηση: απομακρύνει το οπίσθιο τμήμα του σώματος από το αρνί (HC) - οπίσθια κίνηση (HB) - πρόσθια κίνηση (HF)
Όρθια στάση με έκταση της κεφαλής (HP)	Στέκεται με έκταση της κεφαλής περιμένοντας το αρνί να θηλάσει
Βελάσματα (VL / VH)	Παράγει χαμηλής έντασης βελάσματα με το στόμα κλειστό (VL) ή υψηλής έντασης με το στόμα ανοικτό (VH)
Κατανάλωση τροφής (E)	Περιλαμβάνει την αναζήτηση και τη μάσηση τροφής
Συμπεριφορές αρνιών	
Προσπάθεια έγερσης (AS)	Το αρνί στηρίζει το βάρος του σώματος σε τουλάχιστον ένα άκρο
Αναγνώριση προβατίνας (ID)	Έρχεται σε επαφή με οποιοδήποτε σημείο του σώματος της προβατίνας, εκτός από την περιοχή του μαστού
Κατάκλιση (LD)	Το αρνί βρίσκεται σε κατάκλιση αδρανές ή μηρυκάζει
Προσπάθεια θηλασμού (SA)	Βρίσκεται στην περιοχή του μαστού, σε αντίστροφη παράλληλη θέση με το σώμα της προβατίνας
Επιτυχής θηλασμός (SS)	Έχει τη θηλή στο στόμα του και φαίνεται ότι θηλάζει επί >5 s
Επεισόδιο θηλασμού (SB)	Επιτυχής θηλασμός σε διάστημα >10 s από τον προηγούμενο και τον επόμενο Ή μία αλληλουχία επιτυχών θηλασμών σε διάστημα <11 s
Βελάσματα (V)	Παραγωγή ήχων διαφόρων εντάσεων
Κατανάλωση τροφής (E)	Περιλαμβάνει την αναζήτηση και τη μάσηση στερεάς τροφής
Ταυτόχρονος / Ατομικός θηλασμός (SiS / InS) (αφορά μόνο σε δίδυμα αρνιά)	Ένα από δίδυμα αρνιά πραγματοποιεί επιτυχή θηλασμό τον οποίο ακολουθεί και το άλλο αρνί σε <6 s (SiS) / Μόνον ένα από δίδυμα αρνιά πραγματοποιεί επιτυχή θηλασμό (InS)

Υπολογισμοί και στατιστική ανάλυση

Υπολογιστικοί τύποι

Η περίοδος πειραματισμού διαιρέθηκε σε τέσσερα στάδια (Εικόνα II.1), προκειμένου να διευκολυνθούν οι υπολογισμοί και η ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Η πιθανότητα εμφάνισης αλλοιώσεων στις θηλές (IR), κατά τη διάρκεια μίας χρονικής περιόδου (Martin, Meek & Willenberg 1987) υπολογίσθηκε ως εξής: $IR = N / [(A_1 + A_2) / 2]$, όπου N= αριθμός νέων περιστατικών στη διάρκεια της περιόδου, A_1 = αριθμός ζώων σε κίνδυνο στην αρχή της περιόδου, A_2 = αριθμός ζώων σε κίνδυνο στο τέλος της περιόδου.

Η συχνότητα απομόνωσης βακτηρίων από δείγματα υλικού θηλαίου πόρου ή γάλακτος σε συγκεκριμένη χρονική περίοδο (F_i) υπολογίσθηκε ως εξής: $F_i = I / [D_s \times 12 \times 2]$, όπου I= αριθμός δειγμάτων από τα οποία απομονώθηκαν βακτήρια κατά τη διάρκεια της χρονικής περιόδου και D_s = διάρκεια (ημέρες) της χρονικής περιόδου.

Η συχνότητα θετικών δειγμάτων γάλακτος στη δοκιμή CMT σε συγκεκριμένη χρονική περίοδο (F_i) υπολογίσθηκε ως εξής: $F_{CMT} = I / [D_s \times 12 \times 2]$, όπου I= αριθμός δειγμάτων θετικών

(δηλαδή βαθμολόγηση της αντίδρασης με τουλάχιστον "1", Fthenakis 1995) στη δοκιμή CMT και D_s = διάρκεια (ημέρες) της χρονικής περιόδου.

Η μέση τιμή του βάρους των αρνιών στη γέννηση (mLW_b) ή στη λήξη του πειραματισμού (mLW_e) υπολογίστηκε ως εξής: $mLW = [LW_1 + LW_2 + \dots + LW_n] / [N]$, όπου LW_1 = το βάρος κάθε αρνιού στη γέννηση ή τη λήξη του πειραματισμού και $N = 18$ (προκειμένου για υπολογισμούς που αφορούσαν σε όλα τα αρνιά) ή 6 (προκειμένου για υπολογισμούς που αφορούσαν στα μονόδυμα αρνιά) ή 12 (προκειμένου για υπολογισμούς που αφορούσαν στα δίδυμα αρνιά). Η μέση τιμή του ρυθμού ανάπτυξης των αρνιών ($mDGR$) υπολογίστηκε ως εξής: $mDGR = \{[(LW_{e_1} - LW_{b_1}) / 42] + [(LW_{e_2} - LW_{b_2}) / 42] + \dots + [(LW_{e_n} - LW_{b_n}) / 42]\} / [N]$, όπου LW_{b_i} = σωματικό βάρος του αρνιού στη γέννηση, LW_{e_i} = σωματικό βάρος του ίδιου αρνιού στη λήξη του πειραματισμού και $N = 18$ (προκειμένου για υπολογισμούς που αφορούσαν σε όλα τα αρνιά) ή 6 (προκειμένου για υπολογισμούς που αφορούσαν στα μονόδυμα αρνιά) ή 12 (προκειμένου για υπολογισμούς που αφορούσαν στα δίδυμα αρνιά).

Η συνολικά συλλεχθείσα ποσότητα γάλακτος από κάθε προβατίνα (MY_t) στη διάρκεια του πειραματισμού υπολογίστηκε ως εξής: $MY_t = [MYL_1 + MYR_1 + MYL_2 + \dots + MYL_5 + MYR_5]$, όπου MYL_i = ποσότητα γάλακτος που συλλέχθηκε από τον αριστερό μαστικό αδένα του ζώου και MYR_i = η ποσότητα γάλακτος που συλλέχθηκε από το δεξιό μαστικό αδένα του ζώου σε κάθε μέτρηση. Η μέση τιμή της συνολικά συλλεχθείσας ποσότητας γάλακτος από όλες τις προβατίνες του πειραματισμού (mMY_t) υπολογίστηκε ως εξής: $mMY_t = [MY_{t_1} + MY_{t_2} + \dots + MY_{t_n}] / 12$, όπου MY_{t_i} = η συνολικά συλλεχθείσα ποσότητα γάλακτος κάθε προβατίνας. Ανάλογοι μαθηματικοί τύποι χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της μέσης τιμής της συνολικά συλλεχθείσας ποσότητας γάλακτος από προβατίνες με μονόδυμα αρνιά (mMY_{ts}) ή από προβατίνες με δίδυμα αρνιά (mMY_{tt}). Ανάλογοι τύποι χρησιμοποιήθηκαν επίσης για τον υπολογισμό της μέσης τιμής της συνολικά συλλεχθείσας ποσότητας γάλακτος από προβατίνες κατά τη διάρκεια του 3ου ή του 4ου σταδίου του πειραματισμού στις προβατίνες (mMY_{t3} και mMY_{t4} , αντίστοιχα), για προβατίνες με μονόδυμα αρνιά (mMY_{t3s} και mMY_{t4s} αντίστοιχα) ή για προβατίνες με δίδυμα αρνιά (mMY_{t3t} και mMY_{t4t}).

Η συχνότητα μίας συγκεκριμένης συμπεριφοράς (F_b) ανά ζώο (προβατίνα ή αρνί) υπολογίστηκε ως εξής: $F_b = [B_1 + B_2 + \dots + B_n] / [DXS]$, όπου B_i = ο αριθμός των επεισοδίων της συγκεκριμένης συμπεριφοράς κατά τη διάρκεια του συνολικού ημερήσιου χρόνου καταγραφής σε κάθε στάδιο της περιόδου πειραματισμού, D = ο αριθμός των ημερών σε κάθε στάδιο της περιόδου πειραματισμού (δηλαδή, 4 για το 1ο στάδιο, 8 για το 2ο, 16 για το 3ο, 10 για το 4ο), S = ο αριθμός των καθημερινών περιόδων καταγραφής (διάρκειας 30 min καθεμιά). Η μέση τιμή της συχνότητας μίας συγκεκριμένης συμπεριφοράς (mF_b) υπολογίστηκε ως εξής: $mF_b =$

$[Fb_1+Fb_2+\dots+Fb_n]/[N]$ όπου Fb_i = η συχνότητα της συγκεκριμένης συμπεριφοράς για κάθε ζώο (προβατίνα ή αρνί) και N = ο αριθμός των ζώων (12 προκειμένου για υπολογισμούς που αφορούσαν σε προβατίνες, 6 προκειμένου για υπολογισμούς που αφορούσαν σε μονόδυμα αρνιά και 12 προκειμένου για υπολογισμούς που αφορούσαν σε δίδυμα αρνιά). Ειδικότερα, η συχνότητα (Fb) της συμπεριφοράς "Περιποίηση νεογέννητου" (προβατίνες) και της συμπεριφοράς "Προσπάθεια έγερσης" (αρνιά) ανά ζώο και ανά 30 min κατά τη διάρκεια των δύο πρώτων ωρών μετά τον τοκετό υπολογίσθηκε ως εξής: $Fb= [B]/4$ όπου B = ο αριθμός των επεισοδίων της συγκεκριμένης συμπεριφοράς κατά τη διάρκεια των δύο ωρών μετά τον τοκετό.

Η αναλογία της διάρκειας μίας συγκεκριμένης συμπεριφοράς (Db) ανά ζώο (προβατίνα ή αρνί) υπολογίσθηκε ως εξής: $Db= [T_1+T_2+\dots+T_n]X100/[DXSX30]$, όπου T_i = η διάρκεια των επεισοδίων της συγκεκριμένης συμπεριφοράς κατά τη διάρκεια του συνολικού ημερήσιου χρόνου καταγραφής σε κάθε στάδιο της περιόδου πειραματισμού, D = ο αριθμός των ημερών σε κάθε στάδιο της περιόδου πειραματισμού (δηλαδή, 4 για το 1ο στάδιο, 8 για το 2ο, 16 για το 3ο, 10 για το 4ο), S = ο αριθμός των καθημερινών περιόδων καταγραφής (διάρκειας 30 min καθεμιά). Η μέση αναλογία της διάρκειας μίας συγκεκριμένης συμπεριφοράς (mDb) για κάθε ζώο (προβατίνα ή αρνί) υπολογίσθηκε ως εξής: $mDb= [Db_1+Db_2+\dots+Db_n]/[N]$, όπου Db_i = η αναλογία μίας συγκεκριμένης συμπεριφοράς για κάθε ζώο (προβατίνα ή αρνί) και N = ο αριθμός των ζώων (12 προκειμένου για υπολογισμούς που αφορούσαν σε προβατίνες, 6 προκειμένου για υπολογισμούς που αφορούσαν σε μονόδυμα αρνιά και 12 προκειμένου για υπολογισμούς που αφορούσαν σε δίδυμα αρνιά). Ειδικότερα, η μέση αναλογία για τις συμπεριφορές "Περιποίηση νεογέννητου" (προβατίνες) και "Προσπάθεια έγερσης" (αρνιά) ανά ζώο κατά τη διάρκεια των δύο πρώτων ωρών μετά τον τοκετό υπολογίσθηκε ως εξής: $Db= [T]X100/[4 X 30]$, όπου T = η διάρκεια (min) των επεισοδίων της συγκεκριμένης συμπεριφοράς κατά τη διάρκεια των δύο ωρών μετά τον τοκετό. Δεν καταγράφηκε η συνολική διάρκεια στιγμιαίων συμπεριφορών, με διάρκεια κάθε επεισοδίου μικρότερη από 2 s: "Απομάκρυνση", "Εγκατάλειψη / Απόρριψη", "Απώθηση", "Παρεμπόδιση θηλασμού", "Όρθια στάση με έκταση της κεφαλής" και "Βελάσματα" (προβατίνες, αρνιά).

Στα δίδυμα αρνιά, η επιλογή θηλασμού συγκεκριμένου μαστικού αδένος (δεξιού ή αριστερού) από καθένα από τα δύο αρνιά ορίστηκε ως "Σταθερή", όταν η αναλογία των επεισοδίων "Επιτυχούς θηλασμού" σε συγκεκριμένο αδένος ήταν >70% για καθένα από τα δίδυμα αρνιά.

Στατιστική ανάλυση

Όλα τα δεδομένα εισήχθησαν σε υπολογιστικά φύλλα του προγράμματος Excel (Microsoft Corporation, Redmond, ΗΠΑ). Για τη σύγκριση δεδομένων που αφορούσαν στις συμπεριφορές "Περιποίηση νεογέννητου" και "Προσπάθεια έγερσης", εφαρμόστηκε η δοκιμή Student's t-test. Για τις υπόλοιπες παραμέτρους, εφαρμόστηκε ανάλυση της διακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις, σε σχέση με το χρόνο. Ως παράγοντες σύγκρισης ορίστηκαν "προβατίνες με μονόδυμα αρνιά" vs "προβατίνες με δίδυμα αρνιά" (παραμέτροι που αφορούσαν σε προβατίνες) και "μονόδυμα αρνιά" vs "δίδυμα αρνιά" (παραμέτροι που αφορούσαν σε αρνιά), δηλαδή το μέγεθος της τοκετοομάδας.

Τα δεδομένα διαμορφώθηκαν κατάλληλα για τη μέθοδο Mixed Procedure Model, χρησιμοποιώντας το στατιστικό πρόγραμμα Minitab 14 (Minitab Inc., State College, ΗΠΑ). Τα δεδομένα ελέγχθησαν ως προς την κανονικότητα της κατανομής τους, η ημέρα του πειραματισμού ορίστηκε ως τυχαίος παράγοντας, έγιναν δε οι κατάλληλες μετατροπές όπου ήταν απαραίτητο.

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

Αποτελέσματα

Κλινικά ευρήματα

Όλες οι προβατίνες γέννησαν χωρίς μαιευτική επέμβαση. Σε καμία περίπτωση, η διάρκεια του τοκετού δεν ξεπέρασε τις δύο ώρες. Οι προβατίνες περιποιήθηκαν τα νεογνά τους, χωρίς να απαιτηθεί βοήθεια.

Παρατηρήθηκαν αλλοιώσεις στις θηλές (δαγκώματα από τα αρνιά κατά το θηλασμό) δύο προβατίνων με δίδυμα αρνιά ($IR=0,4$) και μίας προβατίνας με ένα αρνί ($IR=0,2$). Οι αλλοιώσεις εμφανίστηκαν κατά τη διάρκεια του 4ου σταδίου της περιόδου πειραματισμού. Πέραν αυτών, τα ζώα παρέμειναν κλινικά υγιή σε όλη διάρκεια του πειραματισμού.

Βακτηριολογικά ευρήματα

Συνολικά συλλέχθηκαν 480 δείγματα υλικού θηλαίου πόρου και γάλακτος. Από 39 (8,1%) δείγματα υλικού θηλαίου πόρου και από 3 (0,6%) δείγματα γάλακτος απομονώθηκαν βακτήρια.

Από τα παραπάνω 39 δείγματα υλικού θηλαίου πόρου, 20 (51%) προήλθαν από δεξιά θηλή και 19 (49%) από αριστερή ($P=0,875$). Επιπλέον, 18 (46%) δείγματα προήλθαν από προβατίνες με ένα αρνί και 21 (54%) από προβατίνες με δύο ($P=0,637$). Η συχνότητα απομόνωσης βακτηρίων (F_i) από υλικό θηλαίου πόρου ανά στάδιο της περιόδου πειραματισμού ήταν 0,125 για το πρώτο στάδιο, 0,083 για το δεύτερο, 0,063 για το τρίτο και 0,069 για το τέταρτο ($P<0,001$ για διαφορές μεταξύ των τεσσάρων σταδίων, $P<0,001$ για διαφορές μεταξύ του πρώτου και καθενός από τα άλλα τρία στάδια, $P>0,100$ για διαφορές μεταξύ του δεύτερου, του τρίτου και του τέταρτου σταδίου).

Στις τρεις περιπτώσεις που απομονώθηκαν βακτήρια από το δείγμα γάλακτος, ίδια βακτήρια είχαν απομονωθεί και από υλικό θηλαίου πόρου. Οι περιπτώσεις αυτές αφορούσαν σε τρεις διαφορετικές προβατίνες.

Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί από τα δείγματα υλικού θηλαίου πόρου ήταν πηκτάση-αρνητικοί Σταφυλόκοκκοι (*Staphylococcus epidermidis*, *S. simulans*, *S. sciuri*, *S. xylosus*, *S. chromogenes*, *Staphylococcus* spp.): 27/39 βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν συνολικά. Άλλα βακτήρια που απομονώθηκαν, ήταν *Bacillus* spp. (3 στελέχη), *M. haemolytica* (3 στελέχη), *Streptococcus* spp. (3 στελέχη), *Arcanobacterium pyogenes* (2 στελέχη) και *S. aureus* (1 στέλεχος). Σε όλες τις περιπτώσεις οι μικροοργανισμοί απομονώθηκαν σε καθαρή καλλιέργεια.

Επαναλαμβανόμενη απομόνωση (σε συνεχόμενες δειγματοληψίες) του ίδιου βακτηριακού είδους, από υλικό θηλαίου πόρου ενός συγκεκριμένου ζώου παρατηρήθηκε με *S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. xylosus*, *M. haemolytica* και *Streptococcus* sp. (δύο συνεχόμενες φορές κάθε στέλεχος).

Κυτταρολογικά ευρήματα

Θετικό αποτέλεσμα στη δοκιμή CMT καταγράφηκε σε 157 (32,7%) δείγματα από 11 προβατίνες. Από αυτά, 73 (46%) προέρχονταν από το δεξιό και 84 (54%) από τον αριστερό μαστικό αδένα ($P=0,216$). Επιπρόσθετα, 66 (42%) από αυτά τα δείγματα προέρχονταν από προβατίνες με ένα αρνί και 91 (58%) από προβατίνες με δίδυμα αρνιά ($P=0,005$). Η συχνότητα των θετικών αποτελεσμάτων στη δοκιμή CMT (F_{CMT}) ήταν 0,917 κατά τη διάρκεια του 1ου σταδίου της περιόδου πειραματισμού, 0,550 κατά τη διάρκεια του 2ου, 0,140 κατά τη διάρκεια του 3ου και 0,181 κατά τη διάρκεια του 4ου ($P<0,001$ για διαφορές μεταξύ των τεσσάρων σταδίων). Από τα 3 δείγματα γάλακτος, από τα οποία απομονώθηκαν βακτήρια, θετικό αποτέλεσμα στη δοκιμή CMT, καταγράφηκε μόνο σε ένα.

Στα επιχρίσματα γάλακτος όπου έγινε χρώση Giemsa, παρατηρήθηκαν λίγα λευκοκύτταρα και επιθηλιακά κύτταρα. Αρχικά (έως την ημέρα D8-D10), η πλειονότητα των λευκοκυττάρων αποτελείτο από μακροφάγα (αναλογία: 60-70%). Σε μικρότερη αναλογία παρατηρήθηκαν ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα (αναλογία: 5-20%) και λεμφοκύτταρα (αναλογία: 10-20%). Στη συνέχεια αυξήθηκε η αναλογία μακροφάγων (>85%) και μειώθηκε αυτή των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων (<10%) και των λεμφοκυττάρων (<10%).

Παραγωγικά χαρακτηριστικά

Η μέση τιμή του βάρους των αρνιών στη γέννησή τους (*mLWb*) ήταν $4,04 \pm 0,8$ kg ($4,24 \pm 0,7$ kg για μονόδυμα αρνιά και $3,90 \pm 0,7$ kg για δίδυμα αρνιά, $P=0,282$), στη δε λήξη του πειραματισμού (D42) (*mLWe*) ήταν $12,5 \pm 3,4$ kg ($14,33 \pm 2,7$ kg για μονόδυμα αρνιά και $11,10 \pm 2,8$ kg για δίδυμα αρνιά, $P=0,01$) (μέση τιμή \pm τυπικό σφάλμα). Ο μέσος ρυθμός ημερήσιας αύξησης βάρους (*mDGR*) ήταν 202 ± 76 g (240 ± 66 g για μονόδυμα αρνιά και 171 ± 66 g για δίδυμα αρνιά, $P=0,023$). Από τα αποτελέσματα συνάγεται ότι το μέγεθος της τοκετοομάδας είχε σημαντική επίδραση στο ρυθμό ανάπτυξης των αρνιών.

Η μέση τιμή της συλλεχθείσας ποσότητας γάλακτος ανά προβατίνα (*mMYt*) ήταν 1490 ± 412 mL (298 mL ανά δειγματοληψία). Τα αντίστοιχα αποτελέσματα για προβατίνες με μονόδυμα (*mMYts*) και δίδυμα (*mMYtt*) αρνιά ήταν: 1336 ± 414 mL (267 mL ανά δειγματοληψία) και 1643 ± 380 mL (329 mL ανά δειγματοληψία) ($P=0,214$ ανά προβατίνα, $P=0,021$ ανά δειγματοληψία). Κατά τη διάρκεια του 3ου σταδίου της περιόδου πειραματισμού, οι αντίστοιχες τιμές ήταν: $mMYt3=943 \pm 305$ mL (314 mL ανά δειγματοληψία), $mMYt3s=830 \pm 337$ mL (277 mL) και $mMYt3t=1054 \pm 247$ mL (352 mL) ($P=0,224$ ανά προβατίνα, $P=0,062$ ανά δειγματοληψία). Κατά τη διάρκεια του 4ου σταδίου της περιόδου πειραματισμού, οι αντίστοιχες τιμές ήταν: $mMYt4=547 \pm 134$ mL (275 mL ανά δειγματοληψία), $mMYt4s=505 \pm 81$ mL (253 mL) και $mMYe4t=589 \pm 171$ mL (295 mL) ($P=0,320$ ανά προβατίνα, $P=0,154$ ανά δειγματοληψία). Δε βρέθηκαν σημαντικές διαφορές στη μέση τιμή της συνολικά συλλεχθείσας ποσότητας γάλακτος μεταξύ 3ου και 4ου σταδίου της περιόδου πειραματισμού (όλα τα ζώα: $P=0,263$ ανά προβατίνα, $P=0,106$ ανά δειγματοληψία - ζώα με ένα αρνί: $P=0,634$ ανά προβατίνα, $P=0,470$ ανά δειγματοληψία - ζώα με δύο αρνιά: $P=0,272$ ανά προβατίνα, $P=0,110$ ανά δειγματοληψία).

Παρατηρήσεις συμπεριφοράς

Συμπεριφορά προβατίνων

Κατά τη διάρκεια του πειραματισμού, καταγράφηκαν οι παρακάτω συμπεριφορές: "Κατάκλιση", "Περιποίηση νεογέννητου", "Παρεμπόδιση θηλασμού" (κυκλική κίνηση, οπίσθια κίνηση, πρόσθια κίνηση), "Όρθια στάση με έκταση της κεφαλής", "Βελάσματα" (χαμηλής έντασης, υψηλής έντασης) και "Κατανάλωση τροφής". Δεν καταγράφηκαν οι παρακάτω συμπεριφορές: "Απομάκρυνση", "Εγκατάλειψη / Απόρριψη" και "Απώθηση".

Η μέση συχνότητα (*mFb*) της συμπεριφοράς "Περιποίηση νεογέννητου" ανά 30 min κατά τη διάρκεια των δύο πρώτων ωρών μετά τον τοκετό ήταν $9,58 \pm 16,3$ επεισόδια ($8,46 \pm 16,7$ για προβατίνες με μονόδυμο αρνί, $11,33 \pm 17,9$ για προβατίνες με δίδυμα αρνιά, $P=0,386$). Η μέση αναλογία της διάρκειας (*mDb*) αυτής της συμπεριφοράς ανά 30 min κατά τη διάρκεια των δύο πρώτων ωρών μετά τον τοκετό ήταν 7,8% ($9,4\%$ για προβατίνες με μονόδυμο αρνιά, $6,2\%$ για προβατίνες με δίδυμα αρνιά, $P=0,013$). Η συγκεκριμένη συμπεριφορά δεν εκδηλώθηκε πέραν της ημέρας του τοκετού.

Προοδευτικά, παρατηρήθηκε αύξηση της συχνότητας της συμπεριφοράς "Κατάκλιση" και μείωση της συχνότητας και της διάρκειας της συμπεριφοράς "Όσφρηση / Επαφή με τη μύτη". Επιπλέον, καταγράφηκε σταδιακή αύξηση της συχνότητας της συμπεριφοράς "Παρεμπόδιση θηλασμού" και της συμπεριφοράς "Όρθια στάση με έκταση της κεφαλής", ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια του 3ου και του 4ου σταδίου της περιόδου πειραματισμού. Μάλιστα, η συμπεριφορά "Παρεμπόδιση θηλασμού" συνήθως συμβαδίζει με τη λήξη της συμπεριφοράς "Επεισόδιο θηλασμού" των αρνιών. Παρατηρήθηκε επίσης σταδιακή μείωση της συχνότητας της συμπεριφοράς "Βελάσματα" κατά τη διάρκεια του 1ου σταδίου της περιόδου πειραματισμού. Μάλιστα, η μέση συχνότητα της συμπεριφοράς αυτής ήταν σημαντικά αυξημένη σε προβατίνες με δίδυμα αρνιά απ' ότι σε προβατίνες με μονόδυμο ($5,25 \pm 10,5$ και $3,71 \pm 2,7$ αντίστοιχα, $P < 0,001$). Τέλος, καταγράφηκε σημαντική διαφορά στη συχνότητα και τη διάρκεια της συμπεριφοράς "Κατανάλωσης τροφής" μεταξύ των σταδίων της περιόδου πειραματισμού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με περισσότερες λεπτομέρειες στους Πίνακες II.iii και II.iv, καθώς και στην Εικόνα II.2.

Συμπεριφορά αρνιών

Κατά τη διάρκεια του πειραματισμού, καταγράφηκαν οι παρακάτω συμπεριφορές: "Προσπάθεια έγερσης", "Αναγνώριση προβατίνας", "Κατάκλιση", "Προσπάθεια θηλασμού", "Επιτυχής θηλασμός", "Επεισόδιο θηλασμού", "Βελάσματα", "Κατανάλωση στερεάς τροφής", "Ταυτόχρονος ή ατομικός θηλασμός" (μόνο σε δίδυμη τοκετοομάδα).

Η μέση συχνότητα (*mFb*) της συμπεριφοράς "Προσπάθεια έγερσης" ανά 30 min κατά τη διάρκεια των δύο πρώτων ωρών μετά τον τοκετό ήταν $0,64 \pm 2,1$ επεισόδια ($0,92 \pm 2,2$ για

μονόδυμα αρνιά και $0,35 \pm 1,0$ για δίδυμα, $P=0,021$). Η μέση αναλογία της διάρκειας (mDb) αυτής της συμπεριφοράς κατά τη διάρκεια των δύο πρώτων ωρών μετά τον τοκετό ήταν 1% (0,7% για μονόδυμα αρνιά και 1,3% για δίδυμα, $P<0,001$).

Προοδευτικά παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση της συχνότητας και της διάρκειας της συμπεριφοράς "Αναγνώριση προβατίνας", "Προσπάθεια θηλασμού" (μόνο σε δίδυμα αρνιά), "Επιτυχής θηλασμός", "Επεισόδιο θηλασμού" και "Βελάσματα", καθώς και σταδιακή αύξηση της διάρκειας της συμπεριφοράς "Κατανάλωση στερεάς τροφής".

Παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ μονόδυμων και δίδυμων αρνιών όσον αφορά στη συχνότητα και τη διάρκεια συγκεκριμένων συμπεριφορών, ως εξής: "Αναγνώριση προβατίνας" $P=0,082$ και $P<0,001$ αντίστοιχα, "Προσπάθεια θηλασμού" $P<0,001$ και για τις δύο παραμέτρους, "Επιτυχής θηλασμός" $P<0,001$ και $P=0,524$ αντίστοιχα, "Επεισόδιο θηλασμού" $P=0,757$ και $P=0,407$ αντίστοιχα, "Βελάσματα" $P=0,450$ (αφορά μόνο στη συχνότητα), "Κατανάλωση στερεάς τροφής" $P=0,127$ και $P=0,312$ αντίστοιχα.

Τέλος, η συχνότητα της συμπεριφοράς "Ταυτόχρονος θηλασμός" (Εικόνα II.7) αυξήθηκε, ενώ η συχνότητα της συμπεριφοράς "Ατομικός θηλασμός" μειώθηκε με την πάροδο της περιόδου πειραματισμού. Η αναλογία "Σταθερής" επιλογής θηλασμού συγκεκριμένου μαστικού αδένου αυξήθηκε προοδευτικά ($P=0,004$). Ειδικότερα, κατά το 1ο στάδιο της περιόδου πειραματισμού εμφανίστηκε σε 0/6 ζεύγη δίδυμων αρνιών, κατά το 2ο στάδιο σε 1/6 ζεύγη, κατά το 3ο στάδιο σε 4/6 ζεύγη και κατά το 4ο σε 5/6 ζεύγη. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με περισσότερες λεπτομέρειες στους Πίνακες II.iii και II.iv, καθώς και στις Εικόνες II.3 έως II.8.

Πίνακας II.iii. Μέση συχνότητα των συμπεριφορών (mFb) που καταγράφηκαν στη διάρκεια του πειραματισμού.

Περιγραφή συμπεριφοράς	Στάδιο πειραματισμού				Τιμές P^*
	1ο	2ο	3ο	4ο	
Συμπεριφορές προβατίνων					
Κατάκλιση	$0,18^a \pm 0,03^†$	$0,27^a \pm 0,03$	$0,32^b \pm 0,07$	$0,86^c \pm 0,28$	$<0,001$
Όσφρηση / Επαφή με τη μύτη	$0,82^a \pm 0,76$	$0,04^b \pm 0,10$	$0,01^b \pm 0,03$	$0,00^b \pm 0,02$	$<0,001$
Παρεμπόδιση θηλασμού	$0,98^a \pm 0,52$	$1,24^b \pm 0,45$	$1,29^b \pm 0,48$	$1,19^b \pm 0,83$	0,038
HC	$0,29 \pm 0,31$	$0,30 \pm 0,24$	$0,25 \pm 0,31$	$0,15 \pm 0,31$	0,008
HB	$0,01 \pm 0,03$	$0,04 \pm 0,10$	$0,02 \pm 0,07$	$0,03 \pm 0,11$	0,412
HF	$0,56 \pm 0,31$	$0,66 \pm 0,35$	$0,78 \pm 0,35$	$0,65 \pm 0,62$	0,317
Όρθια στάση με έκταση της κεφαλής	$0,11^a \pm 0,17$	$0,52^b \pm 0,21$	$0,30^b \pm 0,31$	$0,24^b \pm 0,35$	0,002
Βελάσματα	$4,45^a \pm 6,55$	$0,43^b \pm 0,45$	$0,14^b \pm 0,28$	$0,02^b \pm 0,08$	0,003
VL	$2,35 \pm 4,75$	$0,03 \pm 0,14$	$0,01 \pm 0,07$	$0,00 \pm 0,03$	0,003
VH	$1,55 \pm 2,32$	$0,33 \pm 0,38$	$0,09 \pm 0,24$	$0,02 \pm 0,11$	0,005
Κατανάλωση	$1,26^a \pm 0,48$	$1,20^b \pm 0,17$	$0,32^b \pm 0,07$	$0,86^b \pm 0,28$	0,139

τροφής					
Συμπεριφορές αρνιών (μονόδυμα)					
Αναγνώριση προβατίνας	1,03 ^a ±1,52	0,00 ^b ±0,00	0,00 ^b ±0,00	0,00 ^b ±0,00	<0,001
Κατάκλιση	1,88 ^a ±0,19	1,35 ^b ±0,08	0,91 ^b ±0,05	1,55 ^a ±0,20	<0,001
Προσπάθεια θηλασμού	4,19 ^a ±0,92	4,07 ^a ±0,87	3,37 ^b ±0,13	2,38 ^c ±1,90	0,571
Επιτυχής θηλασμός	1,86 ^a ±0,41	2,70 ^b ±0,54	2,44 ^b ±0,94	1,05 ^a ±1,05	0,097
Επεισόδιο θηλασμού	1,53 ^a ±0,24	1,61 ^a ±0,18	0,72 ^b ±0,21	0,54 ^c ±0,44	0,012
Βελάσματα	2,13 ^a ±3,70	0,00 ^b ±0,00	0,00 ^b ±0,00	0,00 ^b ±0,00	0,002
Κατανάλωση τροφής	0,00 ^a ±0,00	0,01 ^b ±0,03	0,06 ^c ±0,27	0,19 ^d ±0,61	<0,001
Συμπεριφορές αρνιών (δίδυμα)					
Αναγνώριση προβατίνας	0,65 ^a ±0,85	0,00 ^b ±0,00	0,00 ^b ±0,00	0,00 ^b ±0,00	<0,001
Κατάκλιση	1,58 ^a ±0,08	1,55 ^a ±0,03	1,23 ^b ±0,04	1,57 ^a ±0,22	0,002
Προσπάθεια θηλασμού	3,50 ^a ±0,60	2,90 ^b ±0,41	1,82 ^c ±0,51	1,22 ^d ±0,60	<0,001
Επιτυχής θηλασμός	1,50 ^a ±0,31	2,28 ^b ±0,32	1,38 ^a ±0,40	0,79 ^c ±0,45	<0,001
Επεισόδιο θηλασμού	1,51 ^a ±0,24	1,62 ^a ±0,15	1,06 ^b ±0,31	0,80 ^c ±0,49	0,003
Βελάσματα	1,63 ^a ±2,58	0,00 ^b ±0,00	0,00 ^b ±0,00	0,00 ^b ±0,00	<0,001
Κατανάλωση τροφής	0,00 ^a ±0,00	0,00 ^a ±0,00	0,06 ^b ±0,19	0,09 ^b ±0,11	0,002
Ταυτόχρονος / ατομικός θηλασμός	0,17 ^a ±0,29 / 0,76 ^a ±0,86	0,61 ^b ±0,45 / 0,51 ^b ±0,76	0,89 ^c ±0,76 / 0,17 ^c ±0,58	0,96 ^c ±1,02 / 0,05 ^d ±0,15	<0,001 / <0,002

Οι τιμές *P* αναφέρονται σε διαφορές μεταξύ των τεσσάρων σταδίων, στη διάρκεια του πειραματισμού. † μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα. a,b,c,d: διαφορετικοί εκθέτες στην ίδια σειρά υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των σταδίων της περιόδου πειραματισμού (*P*<0,05).

Πίνακας II.iv. Μέση αναλογία των συμπεριφορών (*mDb*) που καταγράφηκαν στη διάρκεια του πειραματισμού.

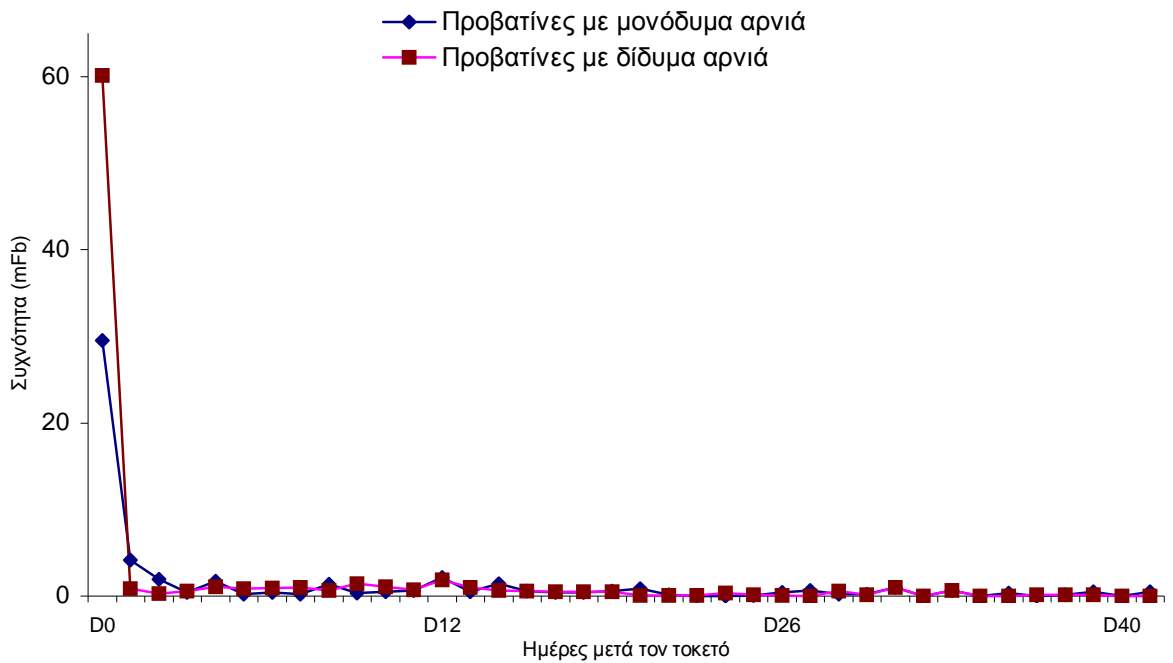
Περιγραφή συμπεριφοράς	Στάδιο πειραματισμού				Τιμές <i>P</i> *
	1ο στάδιο	2ο στάδιο	3ο στάδιο	4ο στάδιο	
Συμπεριφορές προβατινών					
Κατάκλιση	33,6% ^a	46,6% ^a	50,5% ^a	47,1% ^a	0,401
Όσφρηση / Επαφή με τη μύτη	1,0% ^a	0,1% ^b	0,0% ^b	0,0% ^b	<0,001
Κατανάλωση τροφής	14,1% ^a	21,2% ^b	16,6% ^b	17,7% ^a	<0,001
Συμπεριφορές αρνιών (μονόδυμα)					
Αναγνώριση προβατίνας	0,9% ^a	0,0% ^b	0,0% ^b	0,0% ^b	0,003
Κατάκλιση	58,9% ^a	67,0% ^a	62,0% ^a	61,4% ^a	0,040
Προσπάθεια θηλασμού	6,3% ^a	4,3% ^b	3,3% ^b	0,8% ^c	<0,001
Επιτυχής θηλασμός	4,2% ^a	3,4% ^b	2,9% ^b	0,6% ^c	<0,001
Επεισόδιο θηλασμού	4,2% ^a	3,8% ^a	3,0% ^b	0,6% ^c	<0,001

Κατανάλωση τροφής	0,0% ^a	0,0% ^a	0,3% ^c	1,3% ^b	0,004
Συμπεριφορές αρνιών (δίδυμα)					
Αναγνώριση προβατίνας	1,6% ^a	0,0% ^b	0,0% ^b	0,0% ^b	<0,001
Κατάκλιση	51,6% ^a	55,9% ^a	59,0% ^a	61,8% ^a	0,853
Προσπάθεια θηλασμού	3,2% ^a	2,5% ^b	1,6% ^c	1,2% ^d	<0,001
Επιτυχής θηλασμός	4,3% ^a	4,4% ^a	2,0% ^b	0,7% ^c	<0,001
Επεισόδιο θηλασμού	4,5% ^a	4,6% ^a	2,1% ^b	0,7% ^c	<0,001
Κατανάλωση τροφής	0,0% ^a	0,0% ^a	0,3% ^b	0,5% ^c	0,004

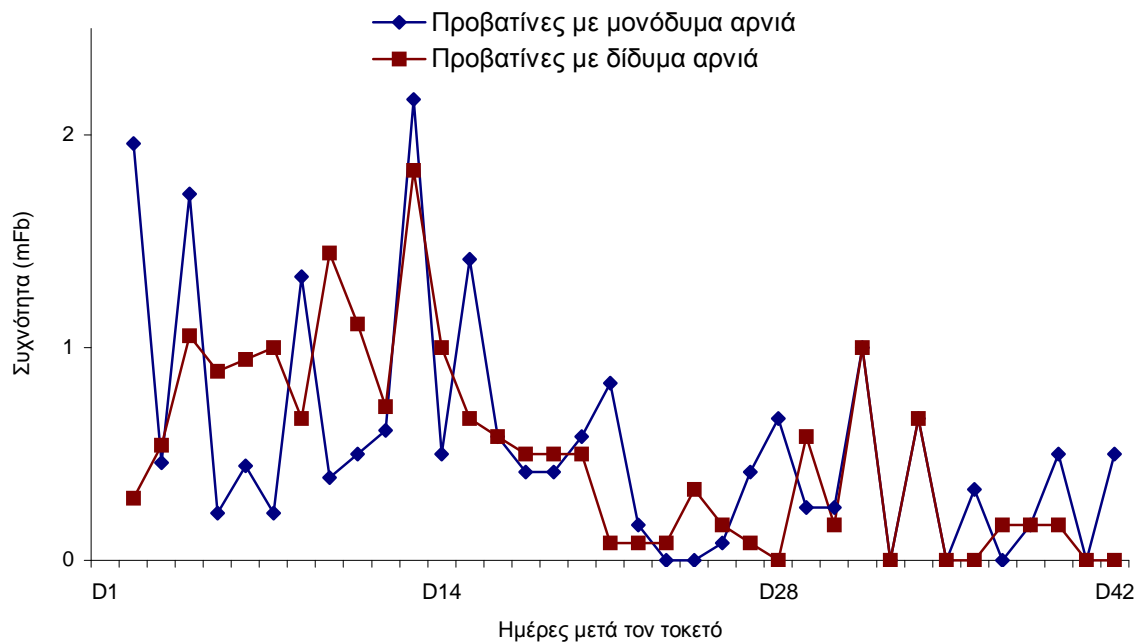
Οι τιμές *P* αναφέρονται σε διαφορές μεταξύ των τεσσάρων σταδίων, στη διάρκεια του πειραματισμού. a,b,c,d: διαφορετικοί εκθέτες στην ίδια σειρά υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των σταδίων της περιόδου πειραματισμού ($P < 0,05$).

Εικόνα II.2. Συχνότητα της συμπεριφοράς "Βελάσματα" σε προβατίνες με μονόδυμα ή δίδυμα αρνιά στη διάρκεια του πειραματισμού.

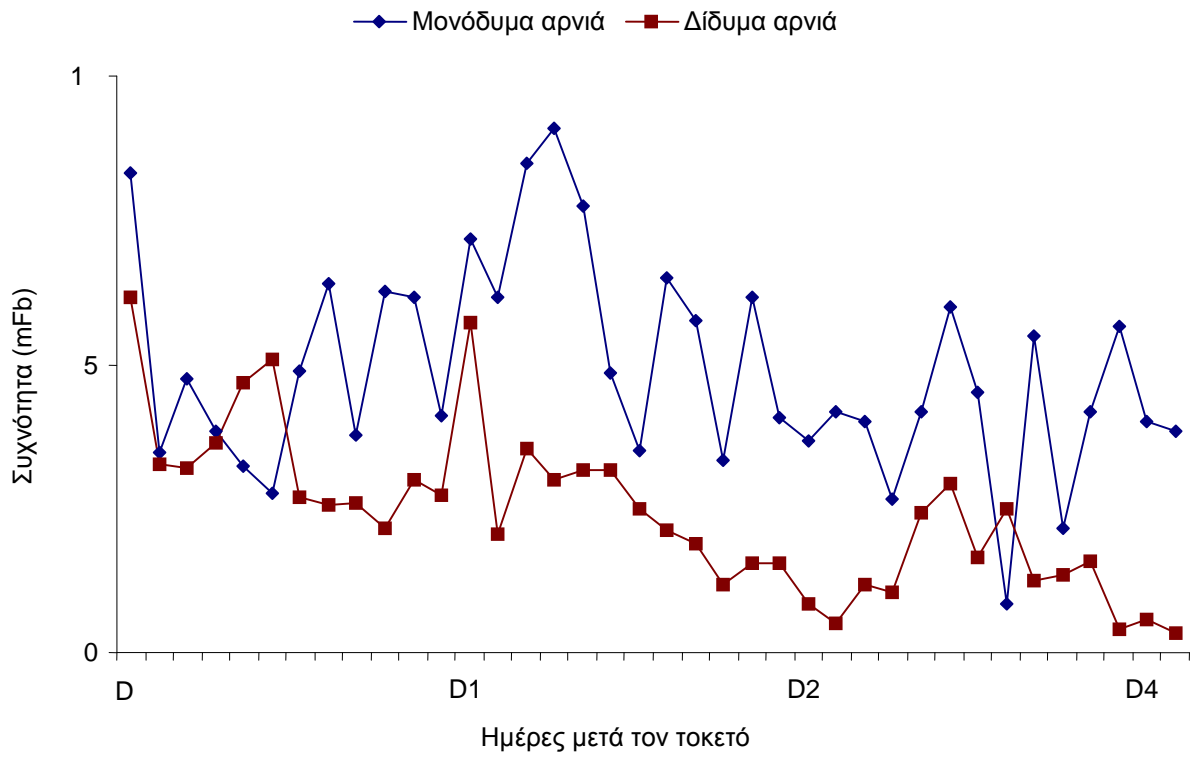
α. Συχνότητα της συμπεριφοράς στη διάρκεια όλου του πειραματισμού: D0 έως D42.



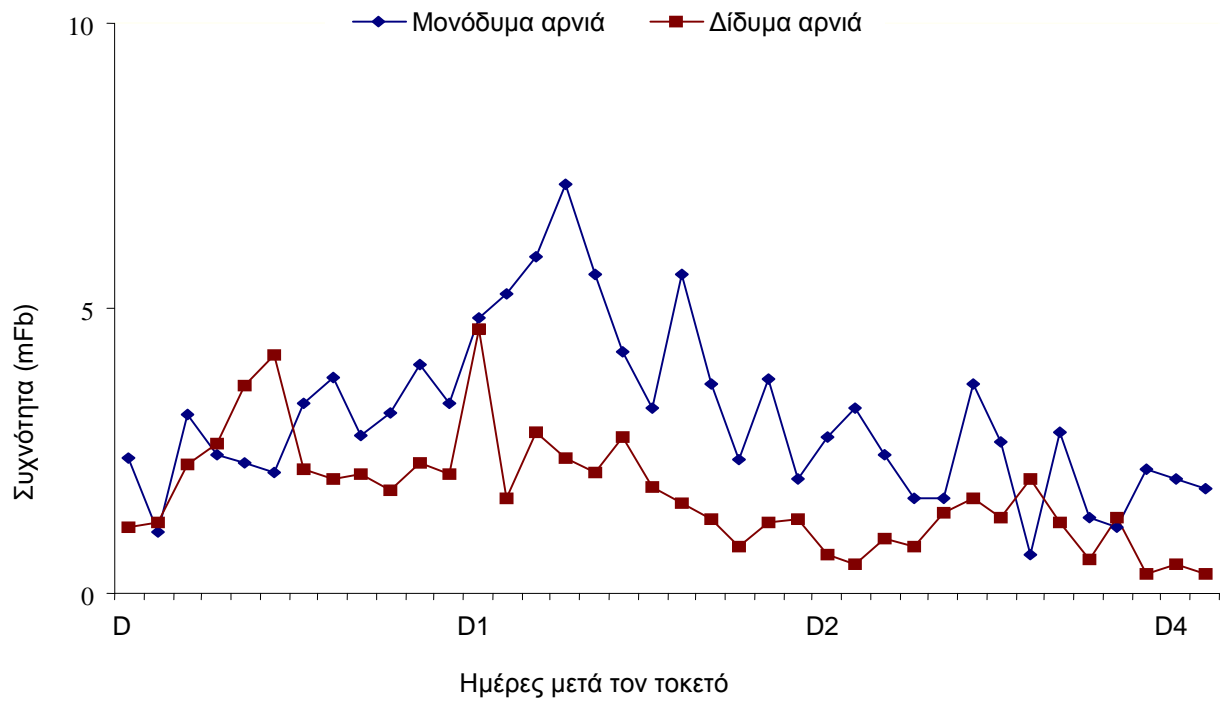
β. Συχνότητα της συμπεριφοράς στη διάρκεια των ημερών D1 έως D42.



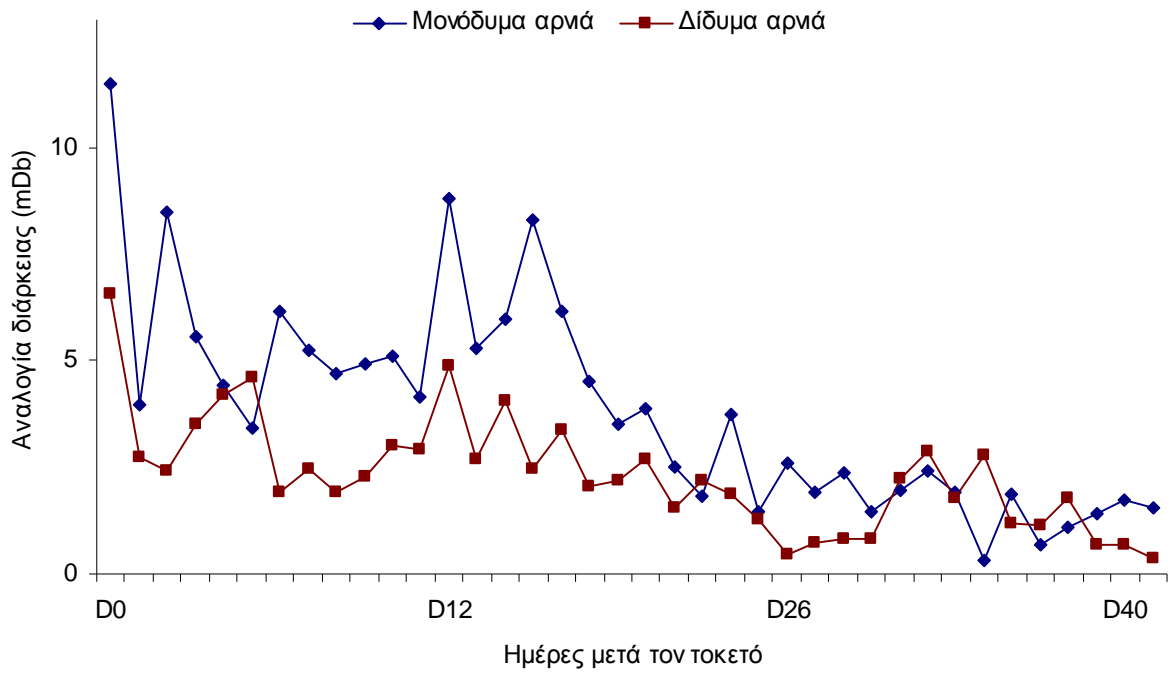
Εικόνα II.3. Συχνότητα της συμπεριφοράς "Προσπάθεια θηλασμού" σε μονόδυμα και δίδυμα αρνιά στη διάρκεια του πειραματισμού.



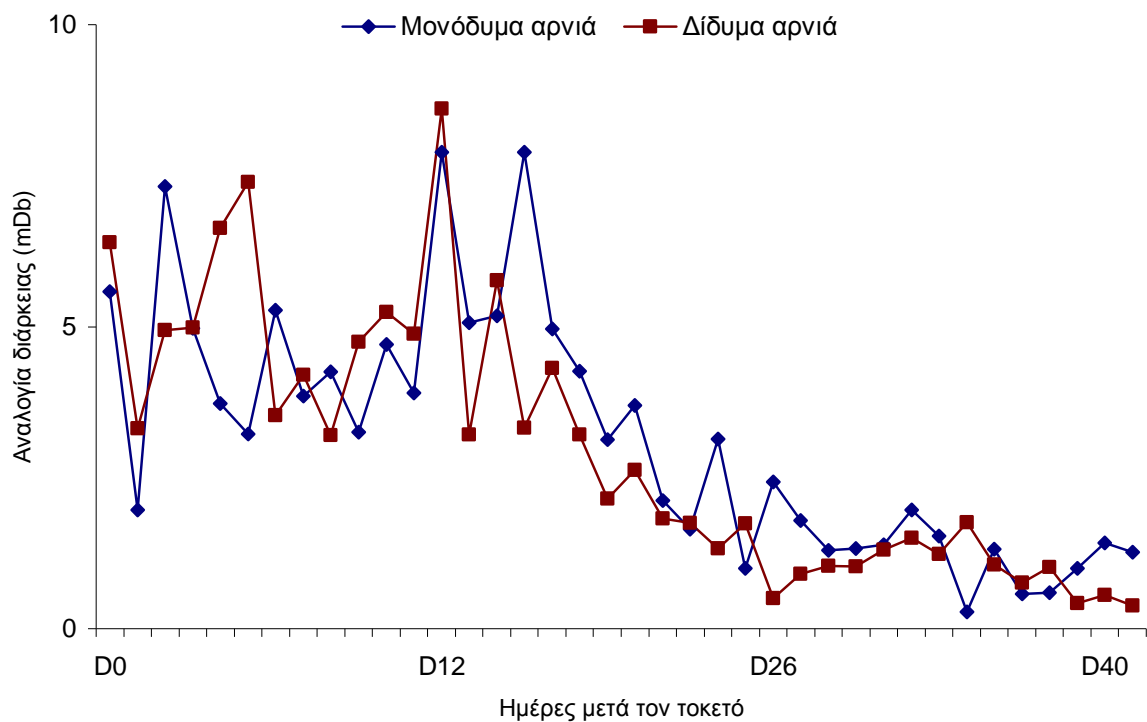
Εικόνα II.4. Συχνότητα της συμπεριφοράς "Επιτυχής θηλασμός" σε μονόδυμα και δίδυμα αρνιά στη διάρκεια του πειραματισμού.



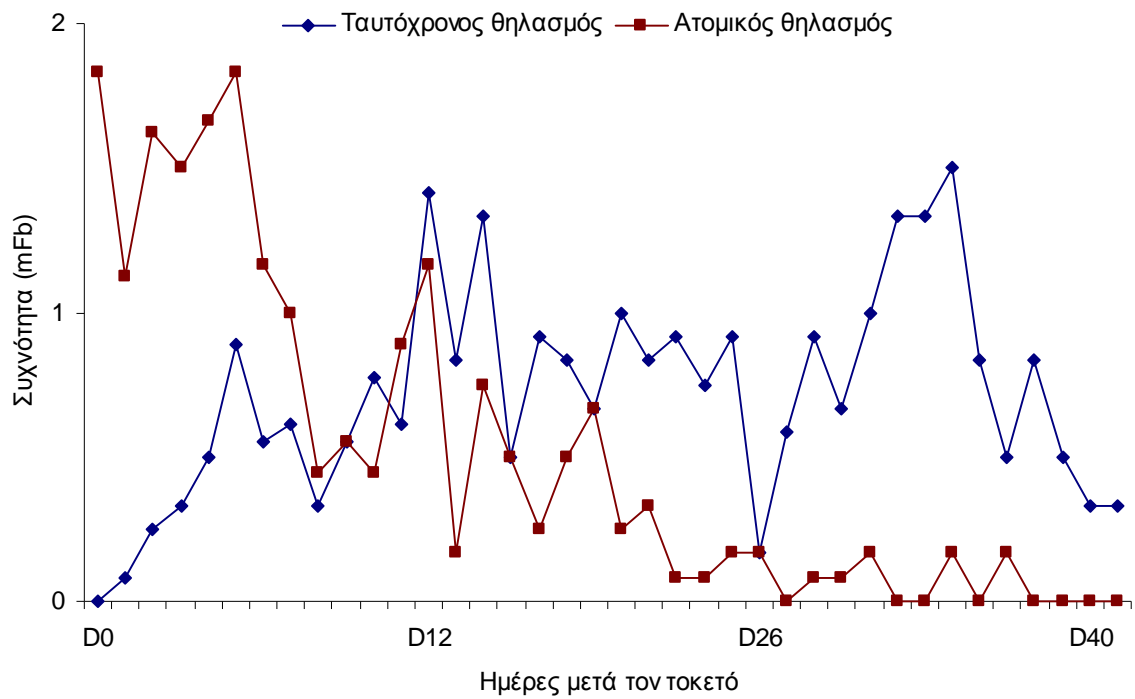
Εικόνα II.5. Αναλογία της διάρκειας της συμπεριφοράς "Προσπάθεια θηλασμού" σε μονόδυμα και δίδυμα αρνιά στη διάρκεια του πειραματισμού.



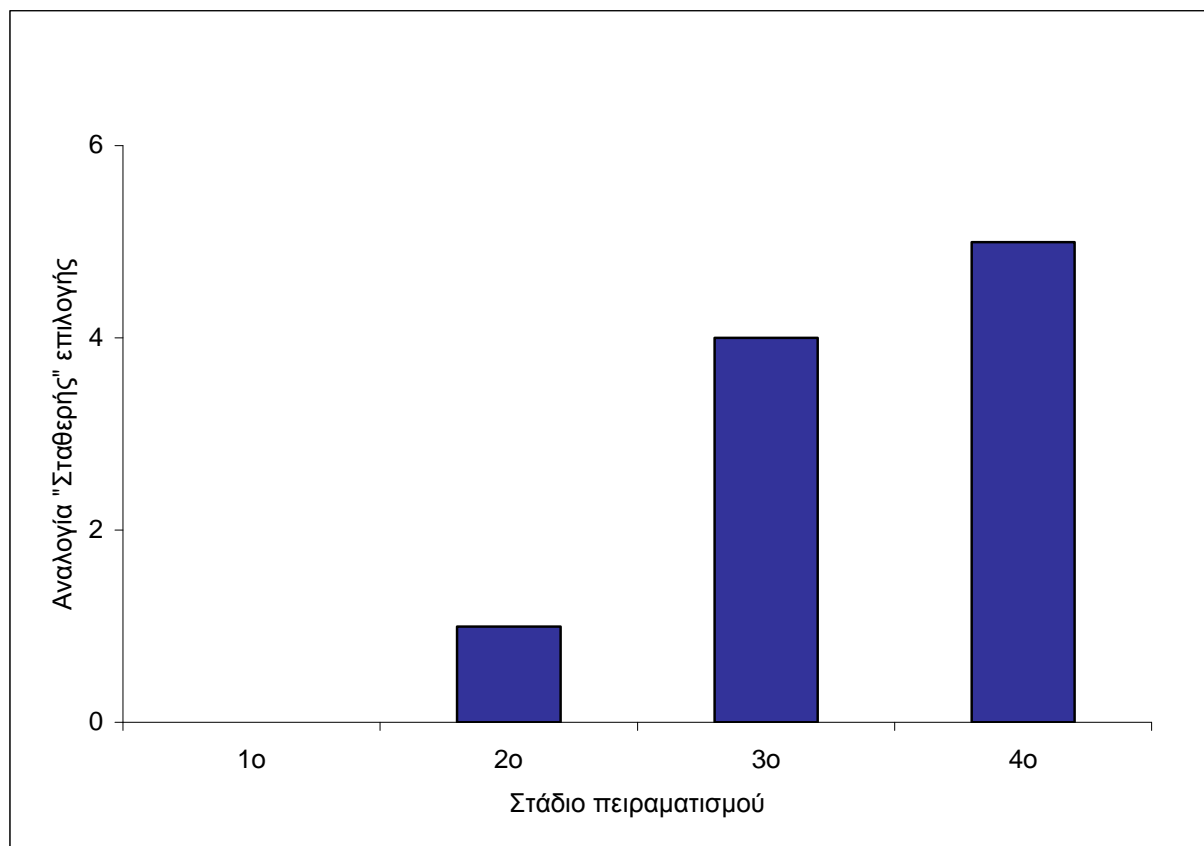
Εικόνα II.6. Αναλογία της διάρκειας της συμπεριφοράς "Επιτυχής θηλασμός" σε μονόδυμα και δίδυμα αρνιά στη διάρκεια του πειραματισμού.



Εικόνα II.7. Αναλογία της συχνότητας της συμπεριφοράς "Ταυτόχρονος θηλασμός / Ατομικός θηλασμός" (SiS / InS) σε δίδυμα αρνιά στη διάρκεια του πειραματισμού.



Εικόνα II.8. Αναλογία "Σταθερής" επιλογής θηλασμού σε ζεύγη δίδυμων αρνιών στη διάρκεια του πειραματισμού.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ III

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΘΗΛΑΣΜΟΥ ΣΤΗ ΜΕΤΑΔΟΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΗ ΘΗΛΗ ΤΩΝ ΠΡΟΒΑΤΙΝΩΝ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σε προηγούμενες μελέτες, αναφέρθηκε το ενδεχόμενο συσχέτισης του θηλασμού με τη μεταφορά μικροοργανισμών προς τη θηλή και ειδικότερα το θηλαίο πόρο (Scott & Jones 1998, Jones & Watkins 2000, Mavrogianni και συν. 2005). Άλλωστε, τα βακτήρια που προκαλούν μαστίτιδα, πιθανόν προέρχονται από το αρνί (στοματική κοιλότητα, ρινοφάρυγγας), από την ίδια την προβατίνα (δέρμα του μαστού) ή/και από το περιβάλλον (στρωμνή). Μετά την είσοδό τους στη θηλή και εφόσον δεν αντιμετωπιστούν με επιτυχία από τους αμυντικούς μηχανισμούς της θηλής (Mavrogianni και συν. 2005), μπορούν να εισβάλλουν στο μαστικό παρέγχυμα και να προκαλέσουν μαστίτιδα.

Σκοποί του πειραματισμού που περιγράφεται στο Κεφάλαιο αυτό, ήταν i) η εκτίμηση διαφορών στους βακτηριακούς πληθυσμούς στο θηλαίο πόρο και στο μαστικό αδένια των προβατίνων πριν και μετά το θηλασμό και ii) η αξιολόγηση παραγόντων που πιθανόν επηρεάζουν αυτές τις διαφορές.

B. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΘΗΛΑΣΜΟΥ ΣΤΗ ΜΕΤΑΔΟΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Υλικά και μέθοδοι

Πειραματικός σχεδιασμός

Στον πειραματισμό αυτόν χρησιμοποιήθηκαν 11 πολύτοκες προβατίνες Καραγκούνικης φυλής. Ο πειραματισμός πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις της Κλινικής, με βάση σχετική άδεια από τη Διεύθυνση Κτηνιατρικής της Νομαρχιακής Αυτοδιοίκησης Καρδίτσας.

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

Τα ζώα επιλέχθηκαν μεταξύ προβατίνων που είχαν γεννήσει φυσιολογικά (δηλαδή χωρίς να απαιτηθεί μαιευτική βοήθεια) το Σεπτέμβριο ή τον Οκτώβριο 2005. Η επιλογή τους έγινε εντός τριών ημερών μετά τον τοκετό τους.

Κανένα ζώο από αυτά που επιλέχθηκαν, δεν είχε ιστορικό μαστίτιδας, ούτε κλινικά συμπτώματα της ασθένειας. Επιπλέον, το γάλα και των δύο μαστικών αδένων κάθε ζώου εξετάστηκε με τη δοκιμή CMT, όπως περιγράφηκε στο Κεφάλαιο II, Τμήμα Β. Σε κανένα ζώο που επιλέχθηκε, η αντίδραση δε βαθμολογήθηκε μεγαλύτερη από "Ιχνη", δηλαδή χαρακτηριστική υποκλινικής μαστίτιδας (Fthenakis 1995). Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε συλλογή υλικού θηλαίου πόρου και δειγμάτων γάλακτος, με βάση τις μεθόδους που περιγράφηκαν αναλυτικά στο Κεφάλαιο II, Τμήμα Β. Από κανένα ζώο δεν απομονώθηκαν βακτήρια πριν την έναρξη του πειραματισμού.

Από τα ζώα που χρησιμοποιήθηκαν, επτά προβατίνες είχαν ένα αρνί και τέσσερις προβατίνες είχαν δίδυμα αρνιά. Τα ζώα μεταφέρθηκαν σε ατομικούς χώρους σταυλισμού με αχυροστρωμένη (1,8 m X 5,0 m). Στους χώρους αυτούς, ήταν δυνατή η οπτική επαφή μεταξύ δύο γειτονικών προβατίνων. Στις προβατίνες χορηγούνταν δύο φορές καθημερινά 600 g συμπυκνωμένης τροφής, καθώς και άριστης ποιότητας σανός κατά βούληση.

Κάθε προβατίνα σημαίνονταν με χρωματιστό αριθμό στη ράχη της, ώστε να διευκολυνθεί η ταυτοποίησή της κατά την παρακολούθηση των καταγραφών συμπεριφοράς. Ομοίως, τα δίδυμα αρνιά σημαίνονταν με χαρακτηριστικά χρωματιστά σημάδια, ώστε να είναι εύκολη η

μετέπειτα ταυτοποίησή τους. Τα χρωματιστά αυτά σημάδια τονίζονταν δύο φορές κάθε εβδομάδα.

Από τους δύο μαστικούς αδένες κάθε προβατίνας συλλέχθηκαν ζεύγη δειγμάτων υλικού θηλαίου πόρου και γάλακτος. Συγκεκριμένα, εφαρμόζονταν τρεις διαφορετικές αλληλουχίες δειγματοληψίας κάθε εβδομάδα. Ο πειραματισμός διήρκεσε έξι εβδομάδες, από τη 2η έως την 7η εβδομάδα μετά τον τοκετό.

Πριν την έναρξη κάθε αλληλουχίας δειγματοληψίας, όλα τα αρνιά απομακρύνονταν από τις προβατίνες για χρονικό διάστημα $60(\pm 3)$ min. Στο διάστημα αυτό τα αρνιά δε λάμβαναν τροφή και νερό. Στο τέλος αυτού του χρονικού διαστήματος, γινόταν η πρώτη δειγματοληψία κάθε αλληλουχίας, δηλαδή χωρίς να υπάρχουν αρνιά στις προβατίνες (δείγματα "Α"). Εντός 30 s από τη λήψη του πρώτου δείγματος, τα αρνιά επέστρεφαν στις μητέρες τους και σχεδόν αμέσως (<7 s) άρχιζαν το θηλασμό. Το δεύτερο δείγμα κάθε αλληλουχίας (δείγματα "Β") συλλέγονταν ακολουθώντας διαφορετικό χρονοδιάγραμμα σε κάθε μία αλληλουχία της ίδιας εβδομάδας.

Τα δείγματα "Β₁" (πρώτη αλληλουχία δειγματοληψίας κάθε εβδομάδας) συλλέγονταν αμέσως μετά τον τερματισμό του επεισοδίου θηλασμού (είτε από το αρνί, είτε από την προβατίνα, χωρίς παρέμβαση του ερευνητή). Τα δείγματα "Β₂" (δεύτερη αλληλουχία δειγματοληψίας κάθε εβδομάδας) συλλέγονταν αμέσως μετά την απομάκρυνση του αρνιού από την προβατίνα, μετά από παραμονή χρονικού διαστήματος 3 min (± 2 s). Τέλος, τα δείγματα "Β₃" (τρίτη αλληλουχία δειγματοληψίας κάθε εβδομάδας) συλλέγονταν αμέσως μετά την απομάκρυνση του αρνιού από την προβατίνα, μετά από παραμονή χρονικού διαστήματος 1 min (± 2 s). Η όλη διαδικασία του θηλασμού γινόταν με τη διακριτική παρακολούθηση από έναν ερευνητή, ώστε να επιβεβαιωθεί ότι κάθε φορά θηλάστηκαν και οι δύο θηλές της προβατίνας.

Τέλος στην πρώτη αλληλουχία δειγματοληψίας κάθε εβδομάδας, σε χρονικό διάστημα 120 min μετά τη συλλογή των δειγμάτων "Β₁" (χρόνος κατά τον οποίο τα αρνιά παρέμεναν με τις προβατίνες) συλλέχθηκαν νέα δείγματα (δείγματα "Γ"). Οι αλληλουχίες δειγματοληψιών παρουσιάζονται σχηματικά στον Πίνακα III.i.

Πίνακας III.i. Εβδομαδιαίες αλληλουχίες δειγματοληψιών (2η έως 7η εβδομάδα μετά τον τοκετό) υλικού θηλαίου πόρου και γάλακτος από προβατίνες, σε συνάρτηση με το θηλασμό από τα αρνιά τους.

1η αλληλουχία δειγματοληψίας	2η αλληλουχία δειγματοληψίας	3η αλληλουχία δειγματοληψίας
------------------------------	------------------------------	------------------------------

κάθε εβδομάδας	κάθε εβδομάδας	κάθε εβδομάδας
Δείγμα πριν το θηλασμό ("A")	Δείγμα πριν το θηλασμό ("A")	Δείγμα πριν το θηλασμό ("A")
↓	↓	↓
Δείγμα μετά τον τερματισμό του επεισοδίου θηλασμού (είτε από το αρνί, είτε από την προβατίνα, χωρίς παρέμβαση) ("B ₁ ")	Δείγμα μετά την απομάκρυνση του αρνιού από την προβατίνα, μετά από παραμονή 3 min ("B ₂ ")	Δείγμα μετά την απομάκρυνση του αρνιού από την προβατίνα, μετά από παραμονή 1 min ("B ₃ ")
↓		
Δείγμα 120 min μετά από το δείγμα "B ₁ " ("Γ")		

Κλινική εξέταση - Δειγματοληψίες - Εργαστηριακές εξετάσεις

Πριν από κάθε αλληλουχία δειγματοληψίας, πραγματοποιείται κλινική εξέταση στα ζώα, όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο II, Τμήμα Β). Συλλέχθηκαν δείγματα υλικού θηλαίου πόρου και δείγματα γάλακτος χρησιμοποιώντας τις τεχνικές που περιγράφηκαν προηγουμένως (Κεφάλαιο II, Τμήμα Β). Σε κάθε περίπτωση εξετάζονταν και λαμβάνονταν δείγματα και από τις δύο θηλές και από τους δύο μαστικούς αδένες κάθε ζώου.

Στα δείγματα υλικού θηλαίου πόρου και στα δείγματα γάλακτος πραγματοποιήθηκε βακτηριολογική εξέταση. Επιπλέον στα δείγματα γάλακτος πραγματοποιήθηκε και εξέταση με τη δοκιμή CMT. Λεπτομέρειες των μεθόδων παρουσιάστηκαν προηγουμένως (Κεφάλαιο II, Τμήμα Β).

Υπολογισμοί και στατιστική ανάλυση

Η περίοδος πειραματισμού διαιρέθηκε σε τρία στάδια, προκειμένου να διευκολυνθούν οι υπολογισμοί και η ανάλυση των αποτελεσμάτων. Το 1ο στάδιο περιλάμβανε τη 2η και την 3η εβδομάδα της γαλακτικής περιόδου, το 2ο στάδιο περιλάμβανε την 4η και την 5η εβδομάδα της γαλακτικής περιόδου και το 3ο στάδιο περιλάμβανε την 6η και την 7η εβδομάδα της γαλακτικής περιόδου.

Προκειμένου να μελετηθεί η πιθανή επίδραση του θηλασμού στα βακτηριολογικά ευρήματα, χρησιμοποιήθηκε ένα πρότυπο στατιστικής ανάλυσης που εφαρμόστηκε σε

προηγούμενη μελέτη με ζεύγη δειγμάτων υλικού θηλαίου πόρου και γάλακτος (Μαυρογιάννη 2006, Μανρογιάννη, Cripps, Tzora, Skoufos & Fthenakis 2006γ). Έτσι έγινε σύγκριση των ευρημάτων της βακτηριολογικής εξέτασης υλικού θηλαίου πόρου και γάλακτος πριν το θηλασμό (δείγματα "Α") με αυτά μετά το θηλασμό (δείγματα "B₁", "B₂" ή "B₃"). Επίσης έγινε σύγκριση των ευρημάτων της βακτηριολογικής εξέτασης υλικού θηλαίου πόρου και γάλακτος μετά το θηλασμό (δείγματα "B₁") με αυτά 120 min αργότερα (δείγματα "Γ"). Πραγματοποιήθηκαν δύο διαφορετικές αναλύσεις: μία για τα δείγματα υλικού θηλαίου πόρου και μία για τα δείγματα γάλακτος. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η δοκιμή Sign, με την παραδοχή ότι κατά τη διάρκεια αυτής της μελέτης ελήφθησαν ζεύγη δειγμάτων, αγνοώντας ταυτόχρονα ότι δείγματα από τις θηλές είχαν ληφθεί σε πολλά διαδοχικά χρονικά σημεία. Αρχικά, η ανάλυση έγινε συνολικά για όλα τα δείγματα κάθε αλληλουχίας που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια του πειραματισμού (δηλαδή, "Α"→"B" και "B₁"→"Γ"). Στη συνέχεια, έγινε ανάλυση για τις τρεις διαφορετικές αλληλουχίες δειγματοληψίας (δηλαδή, "Α"→"B₁", "Α"→"B₂", "Α"→"B₃"). Τέλος, έγινε χωριστή ανάλυση για τις προβατίνες με μονόδυμα και για τις προβατίνες με δίδυμα αρνιά, καθώς και ανάλυση για τα στάδια της περιόδου πειραματισμού. Ειδικά σε αυτήν την περίπτωση, εφαρμόστηκε ανάλυση της διακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις σε σχέση με το χρόνο.

Σε όλες τις περιπτώσεις, η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε χρησιμοποιώντας το στατιστικό πρόγραμμα Minitab 14 (Minitab Inc., State College, ΗΠΑ). Κατά τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η τιμή $P=0,05$ για τον ορισμό της στατιστικής σημαντικότητας.

Αποτελέσματα

Κλινικά ευρήματα

Κατά τη διάρκεια της μελέτης, δεν παρατηρήθηκαν κλινικά συμπτώματα ενδεικτικά μαστίτιδας σε καμία προβατίνα. Σε όλες τις περιπτώσεις, τα αρνιά άρχισαν το θηλασμό σχεδόν αμέσως (<7 s) μετά την επιστροφή στις μητέρες τους και σε όλες τις περιπτώσεις, επιβεβαιώθηκε ότι θηλάστηκαν και οι δύο θηλές της προβατίνας (συμπεριλαμβανομένων και προβατίνων με ένα αρνί).

Συνολικά, συλλέχθηκαν 924 δείγματα υλικού θηλαίου πόρου και 924 δείγματα μαστικού εκκρίματος. Αναλυτικά, συλλέχθηκαν 396 δείγματα "Α" (252 από προβατίνες με ένα αρνί, 144 από προβατίνες με δίδυμα αρνιά), καθώς και 132 δείγματα "B₁", "B₂" ή "B₃" (για κάθε ένα από αυτά, 84 από προβατίνες με ένα αρνί, 48 από προβατίνες με δίδυμα αρνιά). Επίσης

συλλέχθηκαν 132 δείγματα "Γ" (84 από προβατίνες με ένα αρνί, 48 από προβατίνες με δίδυμα αρνιά).

Βακτηριολογικά ευρήματα

Όσον αφορά στα δείγματα "Α", από 14/396 (3,5%) δείγματα υλικού θηλαίου πόρου και από 6/396 (1,5%) δείγματα γάλακτος απομονώθηκαν βακτήρια. Όσον αφορά στα δείγματα "Β", από 42/396 (10,6%) δείγματα υλικού θηλαίου πόρου και από 8/396 (2,0%) δείγματα γάλακτος απομονώθηκαν βακτήρια. Όσον αφορά στα δείγματα "Γ", από 9/132 (6,8%) δείγματα υλικού θηλαίου πόρου και από 2/132 (1,5%) δείγματα γάλακτος απομονώθηκαν βακτήρια (Πίνακας III.ii).

Ζεύγη δειγμάτων πριν και αμέσως μετά το θηλασμό

Οι διαφορές στα αποτελέσματα της βακτηριολογικής εξέτασης του υλικού θηλαίου πόρου πριν και μετά το θηλασμό ήταν στατιστικά σημαντικές για όλα τα δείγματα του πειραματισμού (συγκεντρωτικά όλων των αλληλουχιών δειγματοληψίας), καθώς ο αριθμός των δειγμάτων από τα οποία απομονώθηκαν βακτήρια, αυξήθηκε από 14 σε 42 ($P < 0,001$). Αντίθετα οι διαφορές στα αντίστοιχα αποτελέσματα της βακτηριολογικής εξέτασης του γάλακτος δεν ήταν στατιστικά σημαντικές, καθώς ο αριθμός των δειγμάτων (συγκεντρωτικά όλων των αλληλουχιών δειγματοληψίας) από τα οποία απομονώθηκαν βακτήρια αυξήθηκε από 6 σε 8 ($P = 0,590$).

Όσον αφορά στα ζεύγη δειγμάτων υλικού θηλαίου πόρου πριν και μετά το θηλασμό, σε 40/396 (10,1%) περιπτώσεις τα αποτελέσματα της βακτηριολογικής εξέτασης καθενός από τα δύο δείγματα του ζεύγους ήταν διαφορετικά. Συγκεκριμένα, σε 6 περιπτώσεις απομονώθηκαν βακτήρια μόνον πριν το θηλασμό και σε 34 περιπτώσεις απομονώθηκαν βακτήρια μόνο μετά το θηλασμό.

Η αλληλουχία δειγματοληψίας, ο αριθμός των γαλουχούμενων αρνιών και το στάδιο της γαλακτικής περιόδου δεν είχαν σημαντική επίδραση στις παραπάνω μεταβολές. Ειδικότερα, οι μεταβολές αφορούσαν σε 12/132 "Α"→"Β₁", 15/132 "Α"→"Β₂" και 13/132 "Α"→"Β₃" ζεύγη δειγμάτων ($P > 0,540$). Επίσης αφορούσαν σε 22/252 ζεύγη δειγμάτων από προβατίνες με ένα αρνί και σε 18/144 ζεύγη δειγμάτων από προβατίνες με δίδυμα αρνιά ($P = 0,346$), καθώς και σε 12/132 ζεύγη δειγμάτων στο 1ο στάδιο της περιόδου πειραματισμού, σε 12/132 ζεύγη δειγμάτων στο 2ο στάδιο και σε 16/132 στο 3ο στάδιο ($P > 0,420$).

Όσον αφορά στα ζεύγη δειγμάτων γάλακτος πριν και μετά το θηλασμό, σε 4/396 (1,0%) περιπτώσεις τα αποτελέσματα της βακτηριολογικής εξέτασης καθενός από τα δύο δείγματα του

ζεύγους ήταν διαφορετικά. Συγκεκριμένα, σε μία περίπτωση απομονώθηκαν βακτήρια μόνο πριν το θηλασμό και σε 3 περιπτώσεις απομονώθηκαν βακτήρια μόνο μετά από αυτόν.

Ζεύγη δειγμάτων αμέσως μετά το θηλασμό και 120 min αργότερα

Οι διαφορές στα αποτελέσματα της βακτηριολογικής εξέτασης του υλικού θηλαίου πόρου αμέσως μετά το θηλασμό και 120 min αργότερα δεν ήταν στατιστικά σημαντικές, αν και υπήρχε μείωση του αριθμού των δειγμάτων από τα οποία απομονώθηκαν βακτήρια, από 13 σε 9 ($P=0,375$). Δεν υπήρχε διαφορά στα αντίστοιχα αποτελέσματα της βακτηριολογικής εξέτασης του γάλακτος, καθώς ο αριθμός των δειγμάτων από τα οποία απομονώθηκαν βακτήρια παρέμεινε ο ίδιος (2 δείγματα και στις δύο περιπτώσεις, $P=1,000$).

Όσον αφορά στα ζεύγη δειγμάτων υλικού θηλαίου πόρου μετά το θηλασμό και 120 min αργότερα, σε 12/132 (9,1%) περιπτώσεις τα αποτελέσματα της βακτηριολογικής εξέτασης καθενός από τα δύο δείγματα του ζεύγους ήταν διαφορετικά. Συγκεκριμένα, σε 8 περιπτώσεις απομονώθηκαν βακτήρια μόνο μετά το θηλασμό και σε 4 περιπτώσεις απομονώθηκαν βακτήρια μόνον 120 min αργότερα.

Ο αριθμός των γαλουχούμενων αρνιών και το στάδιο της γαλακτικής περιόδου δεν είχαν σημαντική επίδραση στις παραπάνω μεταβολές. Ειδικότερα, οι μεταβολές αφορούσαν σε 7/84 ζεύγη δειγμάτων από προβατίνες με ένα αρνί και σε 5/48 ζεύγη δειγμάτων από προβατίνες με δίδυμα αρνιά ($P=0,700$), καθώς και σε 3/44 ζεύγη δειγμάτων στο 1ο στάδιο της περιόδου πειραματισμού, σε 5/44 ζεύγη δειγμάτων στο 2ο στάδιο και σε 4/44 στο 3ο στάδιο ($P>0,460$).

Πίνακας III.ii. Αποτελέσματα βακτηριολογικής εξέτασης υλικού θηλαίου πόρου και γάλακτος πριν το θηλασμό ("Α"), μετά το θηλασμό ("Β") και 120 min αργότερα (δείγματα "Γ").

	Προβατίνες με μονόδυμα αρνιά	Προβατίνες με δίδυμα αρνιά	1ο στάδιο ^α	2ο στάδιο	3ο στάδιο	Σύνολο
Δείγματα "Α" (πριν το θηλασμό)						
Υλ. θ. πόρου	5/252	9/144	3/132	5/132	6/132	14/396
Γάλα	3/252	3/144	3/132	2/132	1/132	6/396
Δείγματα "Β" (μετά το θηλασμό)						
Υλ. θ. πόρου	21/252	21/144	13/132	13/132	16/132	42/396
Γάλα	4/252	4/252	3/132	3/132	2/132	8/396
Δείγμα "Β₁"						

Υλ. θ. πόρου	6/84	7/48	3/44	4/44	6/44	13/132
Γάλα	1/84	1/48	1/44	1/44	0/44	2/132
Δείγμα "B ₂ "						
Υλ. θ. πόρου	8/84	9/48	4/44	7/44	6/44	17/132
Γάλα	2/84	2/48	1/44	2/44	1/44	4/132
Δείγμα "B ₃ "						
Υλ. θ. πόρου	7/84	5/48	6/44	2/44	4/44	12/132
Γάλα	1/84	1/48	1/44	0/44	1/44	2/132
Δείγματα "Γ" (120 min αργότερα)						
Υλ. θ. πόρου	5/84	4/48	2/44	3/44	4/44	9/132
Γάλα	1/84	1/48	2/44	0/44	0/44	2/132

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

Υλ. θ. πόρου: υλικό θηλαίου πόρου, α: 1ο στάδιο 2η και 3η εβδομάδα, 2ο στάδιο 4η και 5η εβδομάδα, 3ο στάδιο 6η και 7η εβδομάδα μετά τον τοκετό.

Ταυτότητα βακτηρίων

Σε κάθε περίπτωση, τα βακτήρια απομονώθηκαν σε καθαρή καλλιέργεια. Η πλειονότητα των βακτηρίων που απομονώθηκαν ήταν πηκτάση-αρνητικοί Σταφυλόκοκκοι: *Staphylococcus epidermidis*, *S. simulans*, *S. xylosus*, *S. chromogenes*, *S. sciuri*, *S. caprae*, *S. schleiferi*. Τα βακτήρια αυτά αποτελούσαν το 80% (52/65) των στελεχών από υλικό θηλαίου πόρου και το 69% (11/16) των στελεχών από γάλα. Άλλοι οργανισμοί που απομονώθηκαν ήταν: Στρεπτόκοκκοι, *Escherichia coli*, *Bacillus* spp., *Mannheimia haemolytica*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Klebsiella* sp. και *S. aureus* (Πίνακας III.iii).

Τα δύο στελέχη *M. haemolytica* απομονώθηκαν από υλικό θηλαίου πόρου αμέσως μετά το θηλασμό (ένα από δείγμα "B₂" και ένα από δείγμα "B₃") από δύο διαφορετικές προβατίνες κατά τη διάρκεια της 3ης και της 4ης εβδομάδας της περιόδου πειραματισμού.

Δεν υπήρξε σημαντική διαφορά μεταξύ της αναλογίας των Σταφυλοκόκκων που απομονώθηκαν πριν το θηλασμό (70% των συνολικών στελεχών), αμέσως μετά το θηλασμό (80% των συνολικών στελεχών) ή 120 min αργότερα (91% των συνολικών στελεχών) ($P > 0,290$). Τέλος, από τα 16 βακτηριακά στελέχη από δείγματα γάλακτος, σε 11 περιπτώσεις (69%) το ίδιο στέλεχος απομονώθηκε και από το αντίστοιχο δείγμα υλικού θηλαίου πόρου.

Πίνακας III.iii. Συχνότητα απομόνωσης βακτηριακών ειδών από υλικό θηλαίου πόρου ή από γάλα.

	Δείγματα "Α"		Δείγματα "Β ₁ "		Δείγματα "Β ₂ "		Δείγματα "Β ₃ "		Δείγματα "Γ"		Δείγματα συνολικά	
	υθπ ^α	γ ^α	υθπ	γ	υθπ	γ	υθπ	γ	υθπ	γ	υθπ	γ
Πηκτάση-αρνητικοί Σταφυλόκοκκοι	11	3	10	1	13	3	10	2	8	2	52	11
Στρεπτόκοκκοι	1	2	0	1	0	1	0	0	0	0	1	4
<i>E. coli</i>	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	4	0
<i>Bacillus</i> spp.	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	3	0
<i>M. haemolytica</i>	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	2	0
<i>A. pyogenes</i>	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>Klebsiella</i> sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>S. aureus</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Σύνολο	14	6	13	2	17	4	12	2	9	2	65	16

α: υθπ υλικό θηλαίου πόρου, γ γάλα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV

ΣΥΝΕΠΕΙΕΣ ΤΗΣ ΥΠΟΚΛΙΝΙΚΗΣ ΜΑΣΤΙΤΙΔΑΣ ΣΤΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΘΗΛΑΣΜΟΥ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι συνέπειες της υποκλινικής μαστίτιδας στην γαλακτοπαραγωγή των προβατίνων έχουν τεκμηριωθεί σε πολλές μελέτες. Οι Fthenakis και Jones (1990α), οι Keisler, Andrews και Moffatt (1992) και οι Saratsis και συν. (1999) ανέφεραν ότι η υποκλινική μαστίτιδα προκαλούσε μείωση της παραγωγής γάλακτος. Επιπλέον, οι Kalinowska, Golubinska και Dolinska (1985) και οι Fthenakis και Jones (1990α) ανέφεραν ότι η υποκλινική μαστίτιδα προκαλούσε μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των αρνιών που θήλαζαν προβατίνες με υποκλινική μαστίτιδα. Ως κύριοι αιτιολογικοί παράγοντες της ασθένειας έχουν αναγνωριστεί οι πηκτάση-αρνητικοί Σταφυλόκοκκοι (Fthenakis & Jones 1990β, Las Heras, Dominguez & Fernandez-Garayzabal 1999, Bergonier & Berthelot 2003).

Αν και έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες σχετικά με τη συμπεριφορά του θηλασμού στα πρόβατα (π.χ. Poindron και συν. 1993, Nowak 1996, Dwyer 2003), εν τούτοις σε καμία από αυτές δε λήφθηκε υπόψη η υγεία του μαστικού αδένος, ώστε να αξιολογηθούν οι πιθανές αλληλεπιδράσεις με την υποκλινική μαστίτιδα.

Σε προηγούμενες μελέτες στην υποκλινική μαστίτιδα, αναφέρθηκε η πιθανότητα επίδρασης της ασθένειας στη συμπεριφορά των ζώων (Fthenakis 1988, Fthenakis & Jones 1990α). Όμως αυτό το ενδεχόμενο δεν έχει τεκμηριωθεί επιστημονικά. Σκοπός του πειραματισμού αυτού ήταν η μελέτη της πιθανής επίδρασης της υποκλινικής μαστίτιδας στην συμπεριφορά των προσβεβλημένων προβατίνων και των αρνιών τους κατά την περίοδο του θηλασμού.

B. ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΣΥΝΕΠΕΙΩΝ ΤΗΣ ΥΠΟΚΛΙΝΙΚΗΣ ΜΑΣΤΙΤΙΔΑΣ

Υλικά και μέθοδοι

Πειραματικός σχεδιασμός, πειραματόζωα και βακτηριακό στέλεχος

Στον πειραματισμό αυτόν χρησιμοποιήθηκαν 12 πολύτοκες προβατίνες Καραγκούνικης φυλής. Ο πειραματισμός πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις της Κλινικής, με βάση σχετική άδεια από τη Διεύθυνση Κτηνιατρικής της Νομαρχιακής Αυτοδιοίκησης Καρδίτσας.

Δύο εβδομάδες πριν τον αναμενόμενο τοκετό τους, τα ζώα μεταφέρθηκαν σε ατομικούς χώρους σταυλισμού με αχυροστρωμένη (1,8 m X 5,0 m). Στους χώρους αυτούς, ήταν δυνατή η οπτική επαφή μεταξύ δύο γειτονικών προβατίνων. Στις προβατίνες χορηγούνταν δύο φορές καθημερινά 600 g συμπυκνωμένης τροφής, καθώς και άριστης ποιότητας σανός κατά βούληση.

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

Οι προβατίνες γέννησαν φυσιολογικά (δηλαδή χωρίς να απαιτηθεί μαιευτική βοήθεια) το Φεβρουάριο ή το Μάρτιο 2006. Όλες οι προβατίνες γέννησαν ένα αρνί. Κάθε προβατίνα σημαίνονταν με χρωματιστό αριθμό στη ράχη της, ώστε να διευκολυνθεί η ταυτοποίησή της κατά την παρακολούθηση των καταγραφών συμπεριφοράς. Τα χρωματιστά αυτά σημάδια τονίζονταν δύο φορές κάθε εβδομάδα.

Τα ζώα χωρίστηκαν σε δύο ομάδες (ομάδα A n=8, ομάδα B n=4), με τέτοιο τρόπο ώστε i) υπήρχε ίσος αριθμός αρσενικών και θηλυκών αρνιών σε κάθε ομάδα και ii) δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στο μέσο σωματικό βάρος των αρνιών κάθε ομάδας (ομάδα A \bar{x} =5,19 kg, ομάδα B \bar{x} =4,93 kg, P =0,304).

Στη συνέχεια (8η ημέρα μετά τον τοκετό, D0), στα ζώα της ομάδας A έγινε ενοφθαλμισμός 5×10^6 βακτηριακών κυττάρων (c.f.u.) του στελέχους FCS1, *S. simulans*. Τα βακτήρια ενοφθαλμίστηκαν απευθείας στο γαλακτοφόρο κόλπο ενός μαστικού αδένος των ζώων και προκλήθηκε υποκλινική μαστίτιδα. Από τα οκτώ ζώα, τέσσερα ενοφθαλμίστηκαν στο δεξιό αδένος και τέσσερα στον αριστερό. Η επιλογή της πλευράς ενοφθαλμισμού έγινε τυχαία. Το στέλεχος FCS1 (Fthenakis 1988), που είχε απομονωθεί από περιστατικό οξείας κλινικής

μαστίτιδας στην Αγγλία, έχει τεκμηριωμένη παθογόνο δράση για το μαστικό αδένα των προβάτων (Fthenakis & Jones 1990β). Τα ζώα της ομάδας Β χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.

Η διάρκεια του πειραματισμού ήταν 35 ημέρες μετά τον τοκετό. Στο διάστημα αυτό πραγματοποιείτο κλινική εξέταση των ζώων, γινόταν συλλογή μαστικού εκκρίματος από τις προβατίνες για βακτηριολογική και κυτταρολογική εξέταση και καταγράφονταν η συμπεριφορά των ζώων.

Στο τέλος του πειραματισμού (D27), έγινε ευθανασία των ζώων και πραγματοποιήθηκε παθολογοανατομική εξέταση.

Προετοιμασία του ενοφθαλμίσματος και τεχνική ενοφθαλμισμού

Για να επιτευχθούν άσηπτες, κατά το δυνατόν, συνθήκες μία ημέρα πριν τον ενοφθαλμισμό (ημέρα D-1) οι τρίχες των θηλών κάθε προβατίνας κουρεύτηκαν με ένα ψαλίδι, το δε δέρμα του μαστού και των θηλών απολυμάνθηκε με διάλυμα χλωρεξιδίνης 5% (Hibitane - Zeneca PLC, Macclesfield, Ηνωμένο Βασίλειο).

Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε για τους ενοφθαλμισμούς καλλιεργήθηκε σε τρυβλίο με αιματούχο (5% πρόβειο αίμα) άγαρ Columbia. Έτσι επιβεβαιώθηκε η ταυτότητα του μικροοργανισμού και η καθαρότητα της καλλιέργειας. 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 h.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές υποδεκαπλάσιες διαλύσεις του ζυμού σε αποστειρωμένα σωληνάρια με στείρο φωσφορικό διάλυμα pH 7,3 (PBS) (PBS Dulbecco-Biochrom AG, Berlin, Γερμανία) και 0,2 mL της απαιτούμενης διάλυσης αναρροφήθηκε με μία σύριγγα ισουλίνης. Ο αριθμός των βακτηριακών κυττάρων (c.f.u.) στο ενοφθάμισμα προσδιορίστηκε με βάση τη μέθοδο των Miles και Misra (1938).

Οι προβατίνες της ομάδας Α ενοφθαλμίστηκαν (ημέρα D0) με την παρακάτω μέθοδο. Χρησιμοποιήθηκε στείρος, λεπτός, πλαστικός καθετήρας 20 G (Abboath), από τον οποίο είχε αφαιρεθεί ο μεταλλικός οδηγός - βελόνα. Το ζώο καταρρίφθηκε και στη συνέχεια συγκρατήθηκε σε τέτοια θέση, ώστε η περινεϊκή χώρα του να ακουμπά στο δάπεδο και η ράχη του να στηρίζεται στα πόδια ενός βοηθού. Στη συνέχεια, η θηλή απολυμάνθηκε με διάλυμα ιωδιούχου ποβιδόνης, ξεπλύθηκε με αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό και σκουπίστηκε με αποστειρωμένη γάζα. Ο καθετήρας συγκρατούμενος από το ανώτερο ευρύ πλαστικό στόμιό του, εισήχθη στη θηλή φτάνοντας μέχρι το γαλακτοφόρο κόλπο, οπότε προσαρμόστηκε η σύριγγα με το ενοφθάμισμα και έγινε η έγχυσή του.

Η ίδια τεχνική εφαρμόστηκε για την έγχυση 0,2 mL στείρου PBS, στο γαλακτοφόρο κόλπο του άλλου μαστικού αδένου αυτών των ζώων. Επιπλέον, η ίδια τεχνική εφαρμόστηκε για την έγχυση 0,2 mL στείρου PBS, στο γαλακτοφόρο κόλπο και των δύο μαστικών αδένων των ζώων της ομάδας Β.

Κλινική εξέταση - Δειγματοληψίες - Εργαστηριακές εξετάσεις

Κλινική εξέταση

Η γενική κλινική εξέταση των ζώων και η κλινική εξέταση του μαστικού αδένου και των θηλών τους άρχισε αμέσως μετά τον τοκετό και πραγματοποιούνταν κάθε δύο ημέρες (D-6, D-4 και D-2), έως και την ημέρα του ενοφθαλμισμού (8η ημέρα μετά τον τοκετό, D0). Μετά τον ενοφθαλμισμό, κλινική εξέταση των ζώων γινόταν τις ημέρες D1, D3, D6, D11, D16, D21 και D26. Η κλινική εξέταση έγινε όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο II, Τμήμα Β).

Δειγματοληψίες

Δειγματοληψία μαστικού εκκρίματος πραγματοποιούνταν κάθε δύο ημέρες μετά τον τοκετό (D-6, D-4 και D-2) έως και την ημέρα του ενοφθαλμισμού (D0). Μετά τον ενοφθαλμισμό δειγματοληψία μαστικού εκκρίματος γινόταν τις ημέρες D1, D3, D6, D11, D16, D21 και D26. Η δειγματοληψία μαστικού εκκρίματος γινόταν όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο II, Τμήμα Β). Σε κάθε περίπτωση εξετάζονταν και λαμβάνονταν δείγματα και από τους δύο μαστικούς αδένες κάθε ζώου.

Κυτταρολογική εξέταση

Σε κάθε δείγμα μαστικού εκκρίματος πραγματοποιήθηκε η δοκιμή CMT, όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο II, Τμήμα Β). Το αποτέλεσμα της αντίδρασης βαθμολογήθηκε με έναν από τους πέντε βαθμούς αντίδρασης: "0", "ίχνη", "1", "2", "3", όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο II, Τμήμα Β). Βαθμολόγηση της αντίδρασης με τουλάχιστον "1" θεωρήθηκε ενδεικτική υποκλινικής μαστίτιδας (Fthenakis 1995). Επιπλέον, παρασκευάζονταν επιχρίσματα από το γάλα για χρώση Giemsa (Merck KGaA, Darmstadt, Γερμανία).

Παθολογοανατομική εξέταση

Σε όλα τα ζώα έγινε ευθανασία υπό γενική αναισθησία την ημέρα D27. Σε κάθε ζώο πραγματοποιήθηκε νεκροτομή και, εφαρμόζοντας συνθήκες άσηπτης δειγματοληψίας, ελήφθησαν δείγματα ιστών από το ήπαρ και τον σπλήνα του για βακτηριολογική εξέταση.

Μετά, αφαιρέθηκε ο μαστός και έγινε λεπτομερής εξέτασή του. Αρχικά, οι μαστικοί αδένες εξετάστηκαν με επισκόπηση και ψηλαφήθηκαν σε όλη την έκτασή τους.

Στη συνέχεια 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, λαμβάνονταν 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.

Από κάθε μαστικό αδένα ελήφθησαν δείγματα παρεγχύματος για ιστολογική εξέταση. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε φορμόλη 10%. Τα ιστοτεμάχια του παρεγχύματος εμπεδώθηκαν 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 μαστικού εκκρίματος και ιστών που συλλέχθηκαν, καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία με αιματούχο (5% πρόβειο αίμα) άγαρ Columbia, τα οποία επωάστηκαν σε αερόβιο περιβάλλον σε θερμοκρασία 37 °C έως 72 h. Η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών που αναπτύχθηκαν έγινε με τη χρήση καθιερωμένων βακτηριολογικών εξετάσεων (Barrow & Feltham 1993, Euzeby 1997) και τις ταχείες δοκιμές API.

Μέτρηση παραγωγικών χαρακτηριστικών

Τα αρνιά ζυγίστηκαν αρχικά μετά τη γέννηση τους (D-5) και την ημέρα D0. Στη συνέχεια ζυγίστηκαν την ημέρα D7, την D17 και την D27.

Τις ημέρες εκείνες έγινε και συλλογή κοπράνων απευθείας από το απευθυσμένο, για πραγματοποίηση παρασιτολογικής εξέτασης. Η επεξεργασία των δειγμάτων έγινε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο επίπλευσης σε θειικό ψευδάργυρο για ανίχνευση ωοκύστεων κοκκιδίων και αυγών νηματωδών ελμίνθων. Επιπλέον, έγιναν επιχρίσματα κοπράνων, στα οποία εφαρμόστηκε χρώση σαφρανίνης - κυανού του μεθυλενίου για ανίχνευση ωοκύστεων *Cryptosporidium* spp. (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food 1986).

Πριν τον ενοφθαλμισμό, η παραγωγή γάλακτος από τις προβατίνες μετρήθηκε την ημέρα D0. Στη συνέχεια, η παραγωγή γάλακτος μετρήθηκε την ημέρα D7 και στη συνέχεια ανά δέκα ημέρες, δηλαδή την D17 και την D27, εφαρμόζοντας τη μέθοδο που περιγράφηκε με λεπτομέρειες προηγουμένως (Κεφάλαιο II, Τμήμα Β).

Παρατηρήσεις συμπεριφοράς

Οι καταγραφές της συμπεριφοράς έγιναν χωριστά για κάθε προβατίνα και το αρνί της με δύο ψηφιακούς καταγραφείς εικόνων (92E-Sony, Tokyo, Ιαπωνία), εφαρμόζοντας διαδικασία συνεχούς καταγραφής.

Πριν τον ενοφθαλμισμό, η συμπεριφορά κάθε προβατίνας και του αρνιού της καταγράφονταν κάθε δύο ημέρες (D-5, D-3 και D-1). Μετά τον ενοφθαλμισμό, παρατηρήσεις συμπεριφοράς πραγματοποιήθηκαν τις ημέρες D1, D3, D6, D11, D16, D21 και D26. Η ημερήσια περίοδος παρακολούθησης ορίστηκε από 9.00 έως 21.00 και περιλάμβανε δίωρη απογευματινή διακοπή για τη φροντίδα των ζώων. Κατά την περίοδο παρακολούθησης, δεν επιτρεπόταν καμία είσοδος ατόμων στο χώρο σταυλισμού των ζώων. Σε κάθε ημέρα παρατήρησης πραγματοποιήθηκε μία περίοδος καταγραφής διάρκειας 100 min. Η επιλογή της χρονικής στιγμής εκκίνησης κάθε καταγραφής γινόταν με τέτοιο τρόπο, ώστε οι καταγραφές κατανεμήθηκαν σε όλη την ημερήσια περίοδο παρακολούθησης στη διάρκεια του πειραματισμού.

Οι παρατηρήσεις περιλάμβαναν την καταγραφή όλων των συμπεριφορών των προβατίνων και των αρνιών τους. Ο ορισμός των συμπεριφορών που καταγράφηκαν και μελετήθηκαν ("ηθόγραμμα") παρουσιάζεται στον Πίνακα IV.i.

Πίνακας IV.i. Ορισμός των συμπεριφορών που καταγράφηκαν και μελετήθηκαν ("ηθόγραμμα") στη διάρκεια του πειραματισμού.

Συμπεριφορές προβατίνων	
Κατάκλιση (LD)	Η προβατίνα βρίσκεται σε κατάκλιση αδρανής ή μηρυκάζει
Παρεμπόδιση θηλασμού (HC / HB / HF)	Κινείται καθώς το αρνί πλησιάζει την περιοχή του μαστού: κυκλική κίνηση: απομακρύνει το οπίσθιο τμήμα του σώματος από το αρνί (HC) - οπίσθια κίνηση (HB) - πρόσθια κίνηση (HF)
Όρθια στάση με έκταση της κεφαλής (HP)	Στέκεται με έκταση της κεφαλής περιμένοντας το αρνί να θηλάσει
Βελάσματα (VL / VH)	Παράγει χαμηλής έντασης βελάσματα με το στόμα κλειστό (VL) ή

Κατανάλωση τροφής (E)	υψηλής έντασης με το στόμα ανοικτό (VH) Περιλαμβάνει την αναζήτηση και τη μάσηση τροφής
Συμπεριφορές αρνιών	
Κατάκλιση (LD)	Το αρνί βρίσκεται σε κατάκλιση αδρανές ή μηρυκάζει
Προσπάθεια θηλασμού (SA)	Βρίσκεται στην περιοχή του μαστού, σε αντίστροφη παράλληλη θέση με το σώμα της προβατίνας
Επιτυχής θηλασμός (SS)	Έχει τη θηλή στο στόμα του και φαίνεται ότι θηλάζει επί >5 s
Επεισόδιο θηλασμού (SB)	Επιτυχής θηλασμός σε διάστημα >10 s από τον προηγούμενο και τον επόμενο ή μία αλληλουχία επιτυχών θηλασμών σε διάστημα <11 s
Βελάσματα (V)	Παραγωγή ήχων διαφόρων εντάσεων
Κατανάλωση τροφής (E)	Περιλαμβάνει την αναζήτηση και τη μάσηση στερεάς τροφής

Υπολογισμοί και στατιστική ανάλυση

Υπολογιστικοί τύποι

Η περίοδος πειραματισμού διαιρέθηκε σε τρία στάδια, προκειμένου να διευκολυνθούν οι υπολογισμοί και η ανάλυση των αποτελεσμάτων. Το 1ο στάδιο περιλάμβανε την περίοδο πριν τον ενοφθαλμισμό, το 2ο στάδιο περιλάμβανε την περίοδο από D1 έως D13 και το 3ο στάδιο περιλάμβανε την περίοδο από D14 έως D27.

Η μέση τιμή του βάρους των αρνιών στη γέννηση (mLW_b), στον ενοφθαλμισμό των προβατινών (mLW_i) ή στη λήξη του πειραματισμού (mLW_e) υπολογίστηκε ως εξής: $mLW = [LW_1 + LW_2 + \dots + LW_n] / [N]$, όπου $LW_i =$ το βάρος κάθε αρνιού στη γέννηση, στον ενοφθαλμισμό των προβατινών ή στη λήξη του πειραματισμού και $N = 8$ (προκειμένου για υπολογισμούς που αφορούσαν στα αρνιά της ομάδας A) ή 4 (προκειμένου για υπολογισμούς που αφορούσαν στα αρνιά της ομάδας B). Η μέση τιμή του ρυθμού ανάπτυξης των αρνιών μετά τον ενοφθαλμισμό των προβατινών ($mDGR$) υπολογίστηκε ως εξής: $mDGR = \{[(LW_{e_1} - LW_{i_1}) / 27] + [(LW_{e_2} - LW_{i_2}) / 27] + \dots + [(LW_{e_n} - LW_{i_n}) / 27]\} / [N]$, όπου $LW_i =$ σωματικό βάρος του αρνιού στον ενοφθαλμισμό, $LW_e =$ σωματικό βάρος του ίδιου αρνιού στη λήξη του πειραματισμού και $N = 8$ (προκειμένου για υπολογισμούς που αφορούσαν στα αρνιά της ομάδας A) ή 4 (προκειμένου για υπολογισμούς που αφορούσαν στα αρνιά της ομάδας B).

Για τον υπολογισμό της συλλεχθείσας ποσότητας γάλακτος, σχηματίστηκαν τρεις ομάδες δεδομένων: ενοφθαλμισμένοι αδένες της ομάδας A ($n=8$), υγιείς αδένες της ομάδας A ($n=8$), όλοι οι αδένες της ομάδας B ($n=8$). Η μέση συλλεχθείσα ποσότητα γάλακτος από κάθε ομάδα δεδομένων σε κάθε μέτρηση (mMY) υπολογίστηκε ως εξής: $mMY = [MY_1 + MY_2 + \dots + MY_8] / N$, όπου $MY_i =$ ποσότητα γάλακτος που συλλέχθηκε από κάθε μαστικό αδένα στη μέτρηση και $N = 8$. Η μέση συνολική συλλεχθείσα ποσότητα γάλακτος ($TmMY$) από κάθε ομάδα δεδομένων μετά τον ενοφθαλμισμό υπολογίστηκε ως εξής: $TmMY = [mMY_{D7} + mMY_{D17} + mMY_{D27}]$, όπου $mMY =$ μέση

συλλεχθείσα ποσότητα γάλακτος από κάθε ομάδα δεδομένων σε κάθε μέτρηση (D7, D17 ή D27).

Η συχνότητα μίας συγκεκριμένης συμπεριφοράς (Fb) για κάθε ζώο (προβατίνα ή αρνί) υπολογίστηκε ως εξής: $Fb = [B_1 + B_2 + \dots + B_n] / [D]$, όπου $B_i =$ ο αριθμός των επεισοδίων της συγκεκριμένης συμπεριφοράς κατά τη διάρκεια του συνολικού χρόνου ημερήσιας καταγραφής σε κάθε στάδιο της περιόδου πειραματισμού, $D =$ ο αριθμός των ημερών σε κάθε στάδιο της περιόδου πειραματισμού (δηλαδή, 3 για το 1ο στάδιο, 4 για το 2ο, 3 για το 3ο). Η μέση συχνότητα μίας συγκεκριμένης συμπεριφοράς (mFb) υπολογίστηκε ως εξής: $mFb = [Fb_1 + Fb_2 + \dots + Fb_n] / [N]$ όπου $Fb_i =$ η συχνότητα της συγκεκριμένης συμπεριφοράς για κάθε ζώο (προβατίνα ή αρνί) και $N =$ ο αριθμός των ζώων (8 προκειμένου για υπολογισμούς που αφορούσαν σε ζώα της ομάδας A, 4 προκειμένου για υπολογισμούς που αφορούσαν σε ζώα της ομάδας B).

Η αναλογία της διάρκειας μίας συγκεκριμένης συμπεριφοράς (Db) ανά ζώο (προβατίνα ή αρνί) υπολογίστηκε ως εξής: $Db = [T_1 + T_2 + \dots + T_n] \times 100 / [D \times 100]$, όπου $T_i =$ η διάρκεια των επεισοδίων της συγκεκριμένης συμπεριφοράς κατά τη διάρκεια του συνολικού χρόνου ημερήσιας καταγραφής σε κάθε στάδιο της περιόδου πειραματισμού, $D =$ ο αριθμός των ημερών σε κάθε στάδιο της περιόδου πειραματισμού (δηλαδή, 3 για το 1ο στάδιο, 4 για το 2ο, 3 για το 3ο). Η μέση αναλογία της διάρκειας μίας συγκεκριμένης συμπεριφοράς (mDb) για κάθε ζώο (προβατίνα ή αρνί) υπολογίστηκε ως εξής: $mDb = [Db_1 + Db_2 + \dots + Db_n] / [N]$, όπου $Db_i =$ η αναλογία της συγκεκριμένης συμπεριφοράς για κάθε ζώο (προβατίνα ή αρνί) και $N =$ ο αριθμός των ζώων (8 προκειμένου για υπολογισμούς που αφορούσαν σε ζώα της ομάδας A, 4 προκειμένου για υπολογισμούς που αφορούσαν σε ζώα της ομάδας B). Δεν καταγράφηκε η συνολική διάρκεια στιγμιαίων συμπεριφορών, με διάρκεια κάθε επεισοδίου μικρότερη από 2 s: "Παρεμπόδιση θηλασμού", "Όρθια στάση με έκταση της κεφαλής" και "Βελάσματα" (προβατίνες, αρνιά).

Επιπλέον, η συχνότητα και η αναλογία της διάρκειας των συμπεριφορών "Προσπάθεια θηλασμού" και "Επιτυχής θηλασμός" υπολογίστηκαν σε συνάρτηση με το μαστικό αδέν (δεξιό ή αριστερό), τον οποίο σε κάθε περίπτωση θήλασε το αρνί. Όσον αφορά στα ζώα της ομάδας A, υπολογίστηκαν χωριστά αποτελέσματα για τους ενοφθαλμισμένους ("i") και για τους υγιείς ("c") αδένες. Όσον αφορά στα ζώα της ομάδας B, υπολογίστηκαν χωριστά αποτελέσματα αφενός για δύο δεξιούς και δύο αριστερούς μαστικούς αδένες που επελέγησαν τυχαία για καθεμιά από τις τέσσερις προβατίνες ("p1") και αφετέρου για τους άλλους δύο δεξιούς και δύο αριστερούς μαστικούς αδένες για καθεμιά από τις τέσσερις προβατίνες ("p2")

Στατιστική ανάλυση

Όλα τα δεδομένα εισήχθησαν σε υπολογιστικά φύλλα του προγράμματος Excel (Microsoft Corporation, Redmond, ΗΠΑ). Για τη σύγκριση αναλογιών εφαρμόστηκε η μέθοδος χ^2 . Για τη σύγκριση δεδομένων σε ζεύγη που αφορούσαν ανεξάρτητα δείγματα εφαρμόστηκε η δοκιμή Student's t-test. Για τις υπόλοιπες παραμέτρους, εφαρμόστηκε ανάλυση της συνδιακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις, σε σχέση με το χρόνο. Τα δεδομένα πριν τον ενοφθαλμισμό χρησιμοποιήθηκαν ως συμμεταβλητές.

Τα δεδομένα διαμορφώθηκαν κατάλληλα για τη μέθοδο General Linear Model, χρησιμοποιώντας το στατιστικό πρόγραμμα Minitab 14 (Minitab Inc., State College, ΗΠΑ). Τα δεδομένα ελέχθησαν ως προς την κανονικότητα της κατανομής τους, έγιναν δε οι κατάλληλες μετατροπές όπου ήταν απαραίτητο.

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

Αποτελέσματα

Κλινικά ευρήματα

Όλες οι προβατίνες γέννησαν χωρίς μαιευτική επέμβαση. Σε καμία περίπτωση, η διάρκεια του τοκετού δεν ξεπέρασε τις δύο ώρες. Οι προβατίνες περιποιήθηκαν τα νεογνά τους, χωρίς να απαιτηθεί βοήθεια.

Πρατηρήθηκαν αλλοιώσεις στη θηλή του ενοφθαλμισμένου αδένου (δαγκώματα από το αρνί κατά το θηλασμό) μίας προβατίνας της ομάδας Α. Οι αλλοιώσεις εμφανίστηκαν κατά τη διάρκεια του 3ου σταδίου της περιόδου πειραματισμού. Πέραν αυτών, τα ζώα παρέμειναν κλινικά υγιή σε όλη διάρκεια του πειραματισμού.

Βακτηριολογικά και κυτταρολογικά ευρήματα

Πριν τον ενοφθαλμισμό, δεν απομονώθηκαν βακτήρια από κανένα δείγμα μαστικού εκκρίματος από προβατίνες της ομάδας Α. Αρνητικό αποτέλεσμα στη δοκιμή CMT καταγράφηκε σε 52/72 (72,2%) δείγματα. Στα επιχρίσματα γάλακτος όπου έγινε χρώση Giemsa, παρατηρήθηκαν επιθηλιακά κύτταρα.

Μετά τον ενοφθαλμισμό, όλοι οι ενοφθαλισμένοι μαστικοί αδένες ανέπτυξαν υποκλινική μαστίτιδα. Από όλους τους ενοφθαλισμένους μαστικούς αδένες, απομονώθηκε *S. simulans*

έως τουλάχιστον την ημέρα D16. Συνολικά, το βακτήριο απομονώθηκε από 49/56 δείγματα από ενοφθαλισμένους μαστικούς αδένες. Τα αποτελέσματα των βιοχημικών εξετάσεων στην ταχεία δοκιμή API, στα απομονωθέντα στελέχη, ήταν ίδια με αυτά του ενοφθαλμισθέντος στελέχους.

Την ημέρα D1, η αντίδραση της δοκιμής CMT αυξήθηκε (≥ 2) σε όλους τους ενοφθαλισμένους αδένες. Συνολικά, θετικό αποτέλεσμα στη δοκιμή CMT καταγράφηκε σε 51/56 (91,1%) δείγματα.

Στα επιχρίσματα του μαστικού εκκρίματος βρέθηκαν λευκοκύτταρα. Στην πλειονότητά τους ($\geq 80\%$) ήταν ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα, ενώ τα υπόλοιπα ήταν μακροφάγα και λεμφοκύτταρα (5-15%). Στη συνέχεια (D4), το ποσοστό των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων μειώθηκε (30-70%), ενώ αυτό των μακροφάγων και των λεμφοκυττάρων αυξήθηκε (0-30% και 10-50%, αντίστοιχα).

Από κανένα δείγμα μαστικού εκκρίματος από προβατίνες της ομάδας B, δεν απομονώθηκαν βακτήρια. Σε όλα τα δείγματα (36/36), η δοκιμή CMT είχε αρνητικό αποτέλεσμα. Στα επιχρίσματα γάλακτος όπου έγινε χρώση Giemsa, παρατηρήθηκαν μόνον επιθηλιακά κύτταρα.

Παραγωγικά χαρακτηριστικά

Η μέση τιμή του βάρους των αρνιών την D0 (mLWi) ήταν $6,4 \pm 0,3$ kg για τα αρνιά της ομάδας A και $6,2 \pm 0,2$ kg για τα αρνιά της ομάδας B ($P=0,404$), στη δε λήξη του πειραματισμού (D27) (mLWe) ήταν $12,5 \pm 0,4$ kg και $12,1 \pm 0,7$ αντίστοιχα ($P=0,342$) (μέση τιμή \pm τυπικό σφάλμα). Ο μέσος ρυθμός ημερήσιας αύξησης βάρους από την D0 έως την D27 (mDGR) ήταν 227 ± 16 g για τα αρνιά της ομάδας A και 220 ± 21 g για τα αρνιά της ομάδας B ($P=0,814$).

Δεν υπήρχαν διαφορές στα αποτελέσματα των παρασιτολογικών εξετάσεων μεταξύ των αρνιών των δύο ομάδων. Σε κανένα δείγμα κοπράνων δε βρέθηκαν αυγά νηματωδών ελμίνθων ή ωκύστες *Cryptosporidium* spp. Βρέθηκε όμως μικρός αριθμός ωκύστεων *Eimeria* spp. ως εξής: D0 $12,5 \pm 8,82$ ωκύστες ανά g κοπράνων για αρνιά ομάδας A και $12,5 \pm 12,5$ για αρνιά ομάδας B, D27 $50,0 \pm 9,4$ και $75,0 \pm 14,0$ αντίστοιχα ($P>0,1$).

Πριν τον ενοφθαλμισμό, δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στη ποσότητα γάλακτος που συλλέχθηκε από τους μαστικούς αδένες που επρόκειτο να ενοφθαλμιστούν (ομάδα A), από τους μάρτυρες μαστικούς αδένες στην ίδια ομάδα και από τους μαστικούς αδένες στην ομάδα B ($P>0,480$). Μετά τον ενοφθαλμισμό όμως, η ποσότητα γάλακτος που συλλέχθηκε από τους ενοφθαλισμένους αδένες, μειώθηκε σημαντικά σε σύγκριση με την ποσότητα γάλακτος που συλλέχθηκε από τους άλλους αδένες ($P<0,001$). Αντίθετα, δεν καταγράφηκε σημαντική διαφορά

στην ποσότητα γάλακτος που συλλέχθηκε από τους υγιείς μαστικούς αδένες στην ομάδα A και από όλους τους αδένες στην ομάδα B ($P=0,194$). Επίσης, δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στην ποσότητα γάλακτος που συλλέχθηκε από όλους τους μαστικούς αδένες στην ομάδα A (δηλαδή, ενοφθαλισμένους και υγείς, $n=16$) και από όλους τους αδένες στην ομάδα B ($P=0,366$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με περισσότερες λεπτομέρειες στον Πίνακα IV.ii.

Πίνακας IV.ii. Ποσότητα γάλακτος που συλλέχθηκε από τις προβατίνες στη διάρκεια του πειραματισμού.

	Μέση ποσότητα (mL) γάλακτος που συλλέχθηκε την D0	Μέση συνολική ποσότητα (mL) γάλακτος που συλλέχθηκε μετά την D0 (D7, D17 και D27)
Ομάδα A: ενοφθαλισμένοι αδένες ($n=8$)	141±33	148±46 ^a
Ομάδα A: υγιείς αδένες ($n=8$)	147±26	529±57 ^b
Ομάδα A: όλοι οι αδένες ($n=16$)	144±29	338±49 ^b
Ομάδα B: όλοι οι αδένες ($n=8$)	153±37	593±105 ^b

* μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα. a, b: διαφορετικοί εκθέτες στην ίδια στήλη υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των διαφόρων ομάδων δεδομένων ($P<0,05$).

Παρατηρήσεις συμπεριφοράς

Συμπεριφορά προβατίνων

Κατά τη διάρκεια του πειραματισμού, στις προβατίνες της ομάδας A δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές σε συγκεκριμένες συμπεριφορές ($P>0,05$). Αντίθετα στις προβατίνες της ομάδας B, παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση της συμπεριφοράς "Παρεμπόδιση θηλασμού" και της συμπεριφοράς "Όρθια στάση με έκταση της κεφαλής" ($P=0,016$ και $P<0,001$, αντίστοιχα). Μάλιστα, η συμπεριφορά "Παρεμπόδιση θηλασμού" συνήθως συμβάδιζε με τη λήξη της συμπεριφοράς "Επεισόδιο θηλασμού" των αρνιών. Παρατηρήθηκε επίσης σταδιακή μείωση της συχνότητας της συμπεριφοράς "Βελάσματα" ($P=0,011$).

Όσον αφορά σε διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων, κατά τη διάρκεια του 3ου σταδίου της περιόδου πειραματισμού υπήρξε σημαντικά μεγαλύτερη συχνότητα της συμπεριφοράς "Παρεμπόδιση θηλασμού" και της συμπεριφοράς "Όρθια στάση με έκταση της κεφαλής" στα ζώα της ομάδας B ($P=0,045$ και $P=0,003$, αντίστοιχα). Υπήρχε επίσης, σημαντικά μεγαλύτερη

συχνότητα της συμπεριφοράς "Βελάσματα" στα ζώα της ομάδας A ($P=0,013$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με περισσότερες λεπτομέρειες στους Πίνακες IV.iii και IV.iv.

Πίνακας IV.iii. Μέση συχνότητα των συμπεριφορών (mFb) που καταγράφηκαν στη διάρκεια του πειραματισμού.

Περιγραφή συμπεριφοράς	Στάδιο πειραματισμού / Ομάδα					
	1ο		2ο		3ο	
Συμπεριφορές προβατίνων						
	A	B	A	B	A	B
Κατάκλιση	1,76±0,19	1,81±0,24	1,75±0,08	1,48±0,18	2,39±0,05	2,89±0,15
Παρεμπόδιση θηλασμού	1,64±0,36	0,73±0,28 ^a	3,04±0,34	2,26±0,53 ^b	3,38±0,29 ^k	5,91±0,36 ^{c,l}
HC	0,25±0,15	0,01±0,01	0,18±0,11	0,02±0,02	0,17±0,14	0,15±0,19
HB	0,00±0,00	0,00±0,00	0,12±0,10	0,52±0,26	0,18±0,12	0,20±0,16
HF	1,17±0,29	0,41±0,28	2,11±0,34	1,58±0,36	2,32 0,29	4,97±0,33
Όρθια στάση με έκταση της κεφαλής	1,00±0,23	0,59±0,22 ^a	0,94±0,19	0,68±0,21 ^a	1,05±0,25 ^k	3,72±0,11 ^{b,l}
Βελάσματα	1,58±1,02	1,08±1,08 ^a	0,81±0,79 ^k	0,38±0,51 ^{b,l}	0,38±0,29 ^k	0,20±0,87 ^{b,l}
VL	0,29±0,30	0,75±0,75	0,00±0,00	0,19±0,19	0,00±0,00	0,00±0,00
VH	0,38±0,33	0,08±0,08	0,15±0,24	0,02±0,02	0,07±0,11	0,13±0,42
Κατανάλωση τροφής	4,41±1,15	3,58±1,57	4,40±1,01	3,68±0,63	4,79±0,95	4,08±2,02
Συμπεριφορές αρνιών						
	A	B	A	B	A	B
Κατάκλιση	4,43±0,06	4,35±0,22	4,84±0,09	5,220±,12	4,95±0,06	5,91±0,09
Προσπάθεια θηλασμού	11,38±1,42	13,72±1,42	10,93±1,05 ^k	14,34±1,85 ^l	8,73±0,30 ^k	12,13±0,52 ^l

Επιτυχής θηλασμός	9,44±1,40	12,18±1,54	9,64±1,04 ^k	12,37±1,70 ^l	7,33±0,21 ^k	9,74±0,46 ^l
Επεισόδιο θηλασμού	4,13±0,47	4,57±0,28	3,13±0,16	4,02±0,39	3,71±0,11	4,97±0,19
Βελάσματα	2,47±0,62 ^a	3,12±0,00 ^a	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b
Κατανάλωση τροφής	0,55±0,23 ^a	0,47±0,29 ^a	3,58±0,29 ^b	2,99±0,64 ^b	4,80±0,24 ^b	5,70±0,43 ^b

* μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα. a,b,c: διαφορετικοί εκθέτες στην ίδια σειρά υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των σταδίων της περιόδου πειραματισμού ($P<0,05$). k, l: διαφορετικοί εκθέτες σε γειτονικές τιμές στο ίδιο στάδιο δηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($P<0,05$).

Πίνακας IV.iv. Μέση αναλογία των συμπεριφορών (mDb) που καταγράφηκαν στη διάρκεια του πειραματισμού

Περιγραφή συμπεριφοράς	Στάδιο πειραματισμού / Ομάδα					
	1ο		2ο		3ο	
Συμπεριφορές προβατίνων						
	A	B	A	B	A	B
Κατάκλιση	32,1	36,7	30,2	28,5	44,9	38,2
Κατανάλωση τροφής	22,4	15,3	35,7	35,6	35,3	34,2
Συμπεριφορές αρνιών						
	A	B	A	B	A	B
Κατάκλιση	74,2	73,2 ^a	72,7	67,2 ^b	71,3	55,5 ^c
Προσπάθεια θηλασμού	4,4 ^a	4,6 ^a	4,4 ^a	4,4 ^a	1,7 ^b	2,2 ^b
Επιτυχής θηλασμός	4,2 ^a	4,5 ^a	4,3 ^a	4,3 ^a	1,6 ^b	2,1 ^b
Επεισόδιο θηλασμού	5,8 ^a	4,7 ^a	4,5 ^a	4,5 ^a	1,8 ^b	2,5 ^b
Κατανάλωση τροφής	0,3 ^a	0,2 ^a	3,5 ^b	3,7 ^b	9,8 ^c	6,9 ^c

a,b,c: διαφορετικοί εκθέτες στην ίδια σειρά υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των σταδίων της περιόδου πειραματισμού ($P<0,05$).

Συμπεριφορά αρνιών

Κατά τη διάρκεια του πειραματισμού, στα αρνιά και των δύο ομάδων παρατηρήθηκε προοδευτική μείωση της διάρκειας των συμπεριφορών "Προσπάθεια θηλασμού", "Επιτυχής θηλασμός" και "Επεισόδιο θηλασμού" (ομάδα A: $P<0,025$, ομάδα B: $P<0,045$).

Όσον αφορά σε διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων, μετά τον ενοφθαλμισμό υπήρξε σημαντικά μεγαλύτερη συχνότητα των συμπεριφορών "Προσπάθεια θηλασμού" και "Επιτυχής θηλασμός" στα ζώα της ομάδας B (2ο στάδιο: $P=0,044$ και $P=0,032$ αντίστοιχα, 3ο στάδιο: $P=0,009$ και $P=0,044$ αντίστοιχα). Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκαν ανάλογες διαφορές στη συμπεριφορά "Επεισόδιο θηλασμού" (2ο στάδιο: $P=0,283$, 3ο στάδιο: $P=0,155$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με περισσότερες λεπτομέρειες στους Πίνακες IV.iii και IV.iv.

Όσον αφορά σε διαφορές μεταξύ μαστικών αδένων του ίδιου ζώου, στα αρνιά της ομάδας A παρατηρήθηκε σημαντικά μεγαλύτερη συχνότητα της συμπεριφοράς "Προσπάθεια θηλασμού" και "Επιτυχής θηλασμός" στους υγιείς μαστικούς αδένες ("c") παρά στους ενοφθαλμισμένους ("i") (2ο στάδιο: $P<0,045$, 3ο στάδιο: $P<0,010$). Οι διαφορές παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά την ημέρα D3 ($P<0,05$) και διατηρήθηκαν έως το τέλος του πειραματισμού. Αντίθετα στα αρνιά της ομάδας B, δεν παρατηρήθηκε καμία τέτοια διαφορά μεταξύ των αδένων

"p1" και "p2" (2ο στάδιο: $P>0,060$, 3ο στάδιο: $P>0,250$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με περισσότερες λεπτομέρειες στον Πίνακα IV.v και στην Εικόνα IV.1.

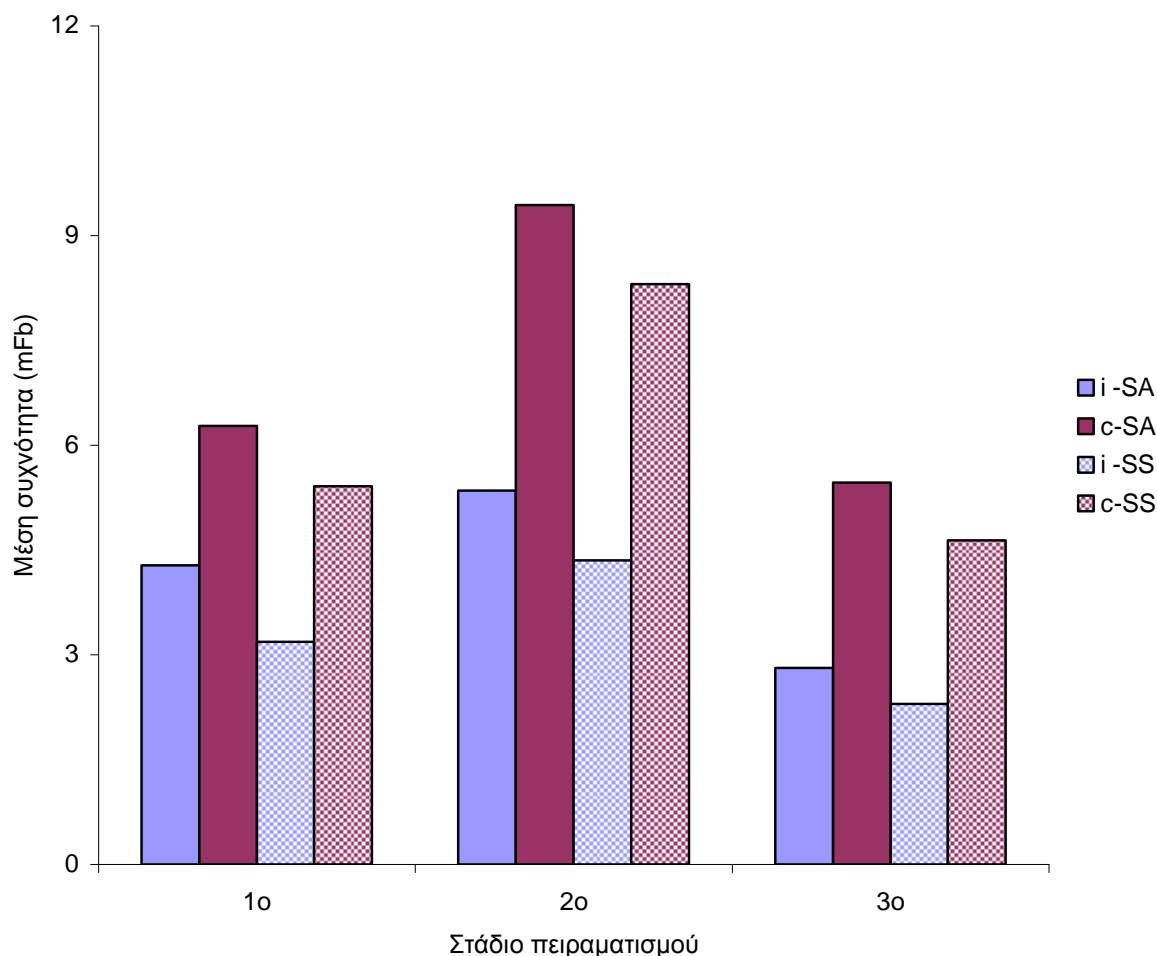
Πίνακας IV.v. Μέση συχνότητα (mFb) και μέση αναλογία (mDb) των συμπεριφορών "Προσπάθεια θηλασμού" και "Επιτυχής θηλασμός" των αρνιών, σε σχέση με το μαστικό αδένωμα που θηλάζονταν κάθε φορά.

Ομάδα	Στάδιο πειραματισμού / Σύνολο μαστικών αδένων					
	1ο		2ο		3ο	
	"i"	"c"	"i"	"c"	"i"	"c"
A						
Προσπάθεια θηλασμού - mFb	4,28±0,84*	6,28±1,1 2	5,35±1,35 ^k	9,44±0,77 ^l	2,81±0,40 ^k	5,47±0,25 ^l
Προσπάθεια θηλασμού - mDb	1,2	2,7	1,0 ^k	3,0 ^l	0,4 ^k	1,2 ^l
Επιτυχής θηλασμός - mFB	3,19±0,88	5,41±1,5 5	4,35±1,28 ^k	8,31±0,69 ^l	2,30±0,32 ^k	4,64±0,19 ^l
Επιτυχής θηλασμός - mDB	1,1	2,6	0,9 ^k	2,9 ^l	0,4 ^k	1,1 ^l
B						
Προσπάθεια θηλασμού - mFb	4,36±1,64	8,09±1,3 4	5,16±2,18	8,26±1,12	4,87±0,61	6,82±0,46
Προσπάθεια θηλασμού - mDb	1,2	2,7	1,1	2,9	0,7	1,1
Επιτυχής θηλασμός - mFB	7,30±1,31	3,51±1,9 2	7,17±1,04	4,35±2,03	5,39±0,40	3,95±0,52
Επιτυχής θηλασμός - mDB	1,1	2,6	1,0	2,8	0,7	1,2

i: ενοφθαλισμένοι αδένες των προβατίνων της ομάδας A, c: υγιείς αδένες των προβατίνων της ομάδας A, p1: δύο δεξιοί και δύο αριστεροί αδένες των προβατίνων της ομάδας B, p2: οι άλλοι δύο αριστεροί και δύο δεξιοί αδένες των προβατίνων της ομάδας B.

* μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα. k, l: διαφορετικοί εκθέτες σε γειτονικές τιμές στο ίδιο στάδιο δηλώνουν στατιστικά σημαντική διάφορα ($P < 0,05$).

Εικόνα IV.1. Σχηματική απεικόνιση της μέσης συχνότητας (mFb) των συμπεριφορών "Προσπάθεια θηλασμού" και "Επιτυχής θηλασμός" των αρνιών της ομάδας A, σε σχέση με το μαστικό αδέννα που θηλάζονταν κάθε φορά.



i-SA: προσπάθειες θηλασμού σε ενοφθαλισμένους μαστικούς αδένες, c-SA: προσπάθεια θηλασμού σε υγιείς μαστικούς αδένες, i-SS: επιτυχείς θηλασμοί σε ενοφθαλισμένους μαστικούς αδένες, c-SS: επιτυχείς θηλασμοί σε υγιείς μαστικούς αδένες.

Πριν την ημέρα D0, τα αρνιά της ομάδας A δεν εκδήλωσαν συγκεκριμένη προτίμηση για την πλευρά και συνακόλουθα για τη θηλή, απ' όπου άρχιζαν ένα "Επεισόδιο θηλασμού" (n=130, 58% στην πλευρά "c", 42% στην πλευρά "i", $P=0,267$). Όμως μετά την D0, τα "Επεισόδια θηλασμού" (2ο στάδιο n=178, 3ο στάδιο n=96) άρχιζαν πιο συχνά στην πλευρά "c" (2ο στάδιο 68%, 3ο στάδιο 76%) παρά στην πλευρά "i" (2ο στάδιο 32%, 3ο στάδιο 24%), διαφορές που ήταν στατιστικά σημαντικές (2ο στάδιο $P=0,001$, 3ο στάδιο $P<0,05$). Αντίθετα, τα αρνιά της ομάδας B άρχιζαν τα "Επεισόδια θηλασμού" (1ο στάδιο n=61, 2ο στάδιο n=76, 3ο στάδιο n=64) με την ίδια συχνότητα στην πλευρά "p1" (64%, 46%, 42%, αντίστοιχα) και την πλευρά "p2" (36%, 54%, 58%, αντίστοιχα) ($P=0.65$, $P=0.643$, $P=0.65$, αντίστοιχα) σε όλη τη διάρκεια του πειραματισμού.

Παθολογοανατομικά ευρήματα

Από 5/8 δείγματα ιστών από τους ενοφθαλμισμένους αδένες (ομάδα Α), απομονώθηκε *S. simulans* σε καθαρή καλλιέργεια. Αντίθετα, από κανένα δείγμα ιστού από τους υγιείς αδένες των προβατίνων της ομάδας Α και από τους αδένες των προβατίνων της ομάδας Β, δεν απομονώθηκαν βακτήρια.

Στο μαστικό παρέγχυμα των ενοφθαλμισμένων αδένων (προβατίνες ομάδας Α) παρατηρήθηκαν χαρακτηριστικά χρόνιας φλεγμονής: διήθηση από λεμφοκύτταρα στο μεσοκυψελιδικό χώρο, καταστροφή των αδενοκυψελίδων και παρουσία ινοβλαστών μεταξύ των αδενοκυψελίδων. Ωστόσο, συνυπήρχαν και περιοχές με χαρακτηριστικά οξείας φλεγμονής (διήθηση από ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα). Στα υπόλοιπα δείγματα (μαστικό παρέγχυμα των υγιών αδένων προβατίνων ομάδας Α και μαστικό παρέγχυμα των αδένων προβατίνων ομάδας Β) δεν παρατηρήθηκαν ιστοπαθολογικά ευρήματα.

ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Πρότυπα μητρικής συμπεριφοράς και συμπεριφοράς θηλασμού σε πρόβατα Καραγκούνικης φυλής

Πρότυπα συμπεριφοράς σε μία φυλή προβάτων γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης

Παρατηρήσεις συμπεριφοράς αμέσως μετά τον τοκετό

Σε κανένα ζώο δεν παρατηρήθηκε αρνητική μητρική συμπεριφορά αμέσως μετά τον τοκετό, μάλλον επειδή τα ζώα που χρησιμοποιήθηκαν στον πειραματισμό ήταν πολύτοκα. Η αρνητική μητρική συμπεριφορά εκδηλώνεται συνήθως μετά από επίτονο τοκετό ή σε νεαρά ζώα χωρίς εμπειρία προηγούμενου τοκετού, καθώς επίσης και ως αντίδραση φόβου έναντι των νεογέννητων (Dwyer & Lawrence 1998).

Οι Dwyer και συν. (1999) ανέφεραν ότι αμέσως μετά τον τοκετό, οι προβατίνες των κρεοπαραγωγικών φυλών αφιέρωναν τον περισσότερο χρόνο τους (>50%) στην περιποίηση και την όσφρηση των νεογέννητων. Στον παρόντα πειραματισμό βρέθηκε ότι οι προβατίνες της Καραγκούνικης φυλής αφιέρωσαν λιγότερο χρόνο στην περιποίηση των νεογέννητων, σε σχέση με όσα αναφέρονται στη βιβλιογραφία για κρεοπαραγωγικές φυλές (Dwyer και συν. 1999). Όσο και αν η άμεση σύγκριση των ευρημάτων δεν είναι δυνατή, οι προβατίνες της Καραγκούνικης φυλής δε χαρακτηρίζονται ως "κακές" μητέρες, δεδομένου ότι δεν καταγράφηκε καμία αρνητική συμπεριφορά. Βέβαια, άλλοι παράγοντες, για παράδειγμα η νεογνική θνησιμότητα, πρέπει να ληφθούν υπόψη για την πλήρη εκτίμηση της ποιότητας της μητρικής συμπεριφοράς.

Η περιποίηση των νεογέννητων είναι σημαντική, διότι έτσι διεγείρεται η αναπνοή και η κινητικότητά τους. Επιπλέον, στα στεγνά νεογέννητα αποφεύγεται η απώλεια θερμότητας και προλαμβάνεται η υποθερμία. Επιπρόσθετα, η περιποίηση διευκολύνει την αναγνώριση του νεογέννητου και την ανάπτυξη του δεσμού και της αναγνώρισης μεταξύ αρνιού και προβατίνας (McGlone & Stobart 1986, Levy & Poindron 1987). Σύμφωνα με τους Dwyer και Lawrence (1998), η φυλή των προβάτων επηρεάζει την ένταση της περιποίησης των νεογέννητων, συμβάλλοντας έτσι στη δημιουργία ισχυρού δεσμού μεταξύ των προβατίνων και των αρνιών και συνεπώς, στη μειωμένη νεογνική θνησιμότητα. Παρόμοια ευρήματα έχουν αναφερθεί και σε αγελάδες. Συγκεκριμένα, οι Selman, McEwan και Fisher (1970) παρατήρησαν ότι αγελάδες κρεοπαραγωγικών φυλών αφιέρωναν περισσότερο χρόνο σε φροντίδα και περιποίηση των νεογέννητων από αγελάδες γαλακτοπαραγωγικών φυλών, οι οποίες μάλιστα εμφάνιζαν συχνότερα εκδηλώσεις αρνητικής μητρικής συμπεριφοράς (π.χ. εγκατάλειψη ή απόρριψη).

Κατά τη διάρκεια της περιποίησης των νεογέννητων αρνιών αμέσως μετά τον τοκετό, βακτήρια, κυρίως δε *Mannheimia haemolytica*, μεταδίδονται από την προβατίνα στο αρνί. Έτσι αποικίζεται η ανώτερη αναπνευστική οδός των αρνιών. Ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός έχει απομονωθεί από 35% των αρνιών ήδη την 4η ημέρα της ζωής τους (Al-Sultan & Aitken 1984). Στην Ελλάδα, αναπνευστικά σύνδρομα που σχετίζονται με *M. haemolytica* σε νεογέννητα αρνιά, δε θεωρούνται τόσο συχνά όσο στη Μ. Βρετανία (Christodoulopoulos & Fthenakis 2005). Αυτό έχει αποδοθεί στη γενικότερη υπόθεση ότι οι Ελληνικές φυλές προβάτων θεωρούνται λιγότερο ευπαθείς σε μολύνσεις, στις διαφορετικές συνθήκες διαχείρισης των εκτροφών, καθώς και στην πιθανή μικρότερη λοιμογόνο δύναμη των στελεχών *M. haemolytica* στην Ελλάδα (Christodoulopoulos, Warnick, Papaioannou & Fthenakis 2002, Christodoulopoulos & Fthenakis 2005, Mavrogrianni & Fthenakis 2005). Όμως, με βάση τα παρόντα ευρήματα πιθανόν τα αρνιά να έχουν μικρότερες πιθανότητες μόλυνσης, εξαιτίας και του λιγότερου χρόνου "Περιποίησης" που δέχονται. Έτσι, το γεγονός αυτό πιθανόν συμβάλλει στη μειωμένη πιθανότητα για εκδήλωση ασθενειών που σχετίζονται με *M. haemolytica*, σε νεογέννητα αρνιά.

Παρατηρήσεις συμπεριφοράς στη διάρκεια της περιόδου θηλασμού

Μία σημαντική διαφορά μεταξύ των ευρημάτων του παρόντος πειραματισμού και των προτύπων συμπεριφοράς που περιγράφονται στη βιβλιογραφία για κρεοπαραγωγικές φυλές (Ewbank 1964, Ewbank & Mason 1967, Hinch 1989, Gordon & Siegmann 1991), είναι η σημαντική προοδευτική αύξηση της συχνότητας και της διάρκειας της συμπεριφοράς "Επεισόδια θηλασμού" στη γαλακτική περίοδο. Η διαπίστωση αυτή γίνεται ακόμη πιο ενδιαφέρουσα, δεδομένου ότι κάποιος θα μπορούσε να ισχυριστεί ότι τα αρνιά των κρεοπαραγωγικών φυλών έχουν μεγαλύτερη ανάγκη από γάλα προκειμένου να καλύψουν τις ανάγκες τους.

Αφενός διαφορετικές ερευνητικές μεθοδολογίες μπορεί να είναι υπεύθυνες για αυτές τις διαφορές. Αφετέρου όμως κάποιος μπορεί να παρουσιάσει μία νέα υπόθεση για την ερμηνεία αυτής της διαφοράς.

Έτσι λοιπόν, οι προβατίνες γαλακτοπαραγωγικών φυλών επιλέγονται για παραγωγή γάλακτος και επομένως, παράγουν περισσότερο γάλα από το αναγκαίο για τα αρνιά τους. Εφόσον όλη η ποσότητα γάλακτος δεν καταναλώνεται, οι μαστικοί αδένες διογκώνονται και προκαλείται δυσφορία στο ζώο. Επιπλέον, η κατάσταση αυτή προδιαθέτει σε μαστίτιδα, καθώς η θηλή δεν κλείνει πλήρως, επιτρέποντας έτσι την είσοδο μικροβίων (Williams & Mein 1987). Τα γάλα που παραμένει στο μαστικό αδένα λειτουργεί ως υπόστρωμα κατάλληλο για την ανάπτυξη μικροβίων. Στην αρχή της γαλακτικής περιόδου οι προβατίνες συνήθως επιτρέπουν στα αρνιά να θηλάσουν οποιαδήποτε στιγμή και για όσο χρονικό διάστημα αυτά επιθυμούν. Άλλωστε η

εκδήλωση της συμπεριφοράς "Όρθια στάση με έκταση της κεφαλής" θεωρείται ως "πρόσκληση" από πλευράς προβατίνας προς το αρνί της για να θηλάσει (Pickup & Dwyer 2001, 2002). Έτσι θα καταναλωθεί όλη η ποσότητα γάλακτος και θα κενωθούν οι μαστικοί αδένες της. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η συμπεριφορά "Παρεμπόδιση θηλασμού" συνήθως συμβάδιζε με τη λήξη της συμπεριφοράς "Επεισόδιο θηλασμού" των αρνιών. Μπορεί λοιπόν να υποθεθεί ότι οι προβατίνες προσπαθούν να τερματίσουν τη διαδικασία θηλασμού, καθώς προοδευτικά αυτή γίνεται επώδυνη, ενόσω ο μαστικός αδένας σταδιακά αδειάζει. Στην πραγματικότητα η συχνότητα της συμπεριφοράς "Παρεμπόδιση θηλασμού" αυξάνεται με την πρόοδο της γαλακτικής περιόδου, καθώς αφενός η παραγωγή γάλακτος σταδιακά μειώνεται και αφετέρου τα αρνιά αναπτύσσουν δόντια με τα οποία δαγκώνουν τη θηλή για να θηλάσουν πιο έντονα. Δεδομένου ότι οι αλλοιώσεις και οι τραυματισμοί στη θηλή προδιαθέτουν σε μαστίτιδα (Mavrogianni, Cripps, Papaioannou, Taitzoglou & Fthenakis 2006), με την αύξηση της συμπεριφοράς "Παρεμπόδιση θηλασμού" μάλλον προστατεύεται ο μαστικός αδένας.

Οι Haenlein και Abdellatif (2004) πρότειναν την άρμεξη των προβατίνων πριν ακόμη από τον απογαλακτισμό των αρνιών τους, ώστε να αυξηθεί η συνολική παραγωγή γάλακτος. Τα ευρήματα σχετικά με τη συμπεριφορά αυτήν στον παρόντα πειραματισμό επιβεβαιώνουν τη σημασία της παραπάνω πρότασης. Μάλιστα, η ταυτόχρονη εφαρμογή άρμεξης και θηλασμού θα μπορούσε να ξεκινούσε από την 30η ημέρα της γαλακτικής περιόδου, όταν η διάρκεια των επεισοδίων της συμπεριφοράς "Επιτυχής θηλασμός" μειώνεται, ενώ αυξάνεται η συχνότητα της συμπεριφοράς "Κατανάλωση τροφής".

Αλληλεπιδράσεις μεταξύ συμπεριφοράς θηλασμού και υγείας του μαστικού αδένα

Όπως και σε προηγούμενες κλινικές μελέτες (Mavrogianni, Cripps & Fthenakis 2007), απομονώθηκε σημαντικά μικρότερος αριθμός βακτηρίων από δείγματα γάλακτος απ' ότι από δείγματα υλικού θηλαίου πόρου. Κατά τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου, η θηλή βρίσκεται διαρκώς εκτεθειμένη σε μικροοργανισμούς. Αυτοί μπορεί να εισέλθουν στο θηλαίο πόρο, αλλά η περαιτέρω άνοδός τους προς το μαστικό παρέγχυμα είναι περιορισμένη. Τα ευρήματα αυτά είναι σε συμφωνία με προηγούμενες πειραματικές μελέτες, όπου τεκμηριώθηκε ο προστατευτικός ρόλος της υγιούς θηλής (Mavrogianni και συν. 2005).

Σε προηγούμενες μελέτες (Jones 1991) αναφέρθηκε ότι οι προβατίνες που γαλουχούσαν δίδυμα αρνιά είχαν μεγαλύτερη προδιάθεση σε εκδήλωση μαστίτιδας απ' ότι ζώα που γαλουχούσαν μονόδυμα αρνιά. Στον παρόντα πειραματισμό δε βρέθηκε σημαντική διαφορά

στην αναλογία των στελεχών μικροβίων που απομονώθηκαν από προβατίνες με έναν αρνί ή από προβατίνες με δύο αρνιά. Φαίνεται λοιπόν ότι το μέγεθος της τοκετοομάδας δεν επηρεάζει τη μόλυνση της θηλής. Προφανώς αυτό αποτελεί συνέπεια της απουσίας σημαντικής διαφοράς στη συχνότητα και τη διάρκεια της συμπεριφοράς "Επεισόδιο θηλασμού" μεταξύ μονόδυμων και δίδυμων αρνιών. Συνεπώς, μπορεί να υποθεθεί ότι η πιθανή προδιάθεση προβατίνων με δίδυμα αρνιά σε μαστίτιδα, μάλλον οφείλεται σε άλλους παράγοντες, για παράδειγμα σε μειωμένη δυνατότητα ανοσολογικής ανταπόκρισης του μαστικού αδένος σε τέτοια ζώα.

Πράγματι, οι Caroprese, Sevi, Schena, Annicchiarico & Muscio (2005) ανέφεραν ότι η ανοσολογική ανταπόκριση των προβατίνων που γαλουχούσαν δίδυμα αρνιά, ήταν μειωμένη αμέσως μετά τον τοκετό σε σχέση με την 35η ημέρα της γαλακτικής περιόδου. Αντίθετα δεν παρατήρησαν ανάλογη διαφορά σε προβατίνες με ένα αρνί. Πιθανόν λοιπόν, αυτή η ανοσολογική διαφορά να αποτελεί συνέπεια των αυξημένων αναγκών που απαιτούνται για τη γαλουχία δίδυμων αρνιών (Houdijk, Kyriazakis, Jackson, Huntley & Coop 2003) και να συμβάλλει στην προδιάθεση προβατίνων με δίδυμα αρνιά σε μαστίτιδα.

Αν και προβατίνες με δίδυμα αρνιά παράγουν συνολικά μεγαλύτερη ποσότητα γάλακτος από προβατίνες με ένα αρνί, καθένα από τα δίδυμα αρνιά καταναλώνει μικρότερη ποσότητα γάλακτος από ένα μονόδυμο. Έτσι, τα δίδυμα αρνιά είχαν σημαντικά μικρότερη ημερήσια αύξηση σωματικού βάρους από τα μονόδυμα: 171 g σε έναντι 240 g. Καθώς λοιπόν τα δίδυμα αρνιά καταναλώνουν μικρότερη ποσότητα γάλακτος, θηλάζουν πιο λαίμαργα και έτσι δαγκώνουν πιο έντονα τις θηλές της μητέρας τους. Άμεση συνέπεια αυτού είναι το αυξημένο ποσοστό εμφάνισης δαγκωμάτων στις θηλές των προβατίνων. Στον παρόντα πειραματισμό βρέθηκε διπλάσιο ποσοστό δαγκωμάτων στις θηλές προβατίνων με δίδυμα αρνιά απ' ό,τι σε προβατίνες με μονόδυμα αρνιά. Μάλιστα ο Jones (1991) ανέφερε ότι η προδιάθεση των προβατίνων με δίδυμα αρνιά σε μαστίτιδα, πιθανόν ενισχύεται από την αυξημένη συχνότητα αλλοιώσεων στις θηλές σε τέτοια ζώα. Τα αποτελέσματα του παρόντος πειραματισμού υποστηρίζουν την άποψη αυτήν, με βάση τα ηθολογικά και βακτηριολογικά ευρήματα. Άλλωστε, οι Manrogianni, Cripps, Papaioannou και συν. (2006) απέδειξαν ότι οι αλλοιώσεις στις θηλές προδιέθεταν σε μαστίτιδα ως συνέπεια της μείωσης των φυσικών αμυντικών μηχανισμών στη θηλή. Φαίνεται λοιπόν ότι ο πιθανός ρόλος των δίδυμων αρνιών σχετίζεται με τη μείωση της αμυντικής ικανότητας του μαστικού αδένος, παρά με την αυξημένη έκθεσή του σε παθογόνους μικροοργανισμούς.

Η συχνότητα απομόνωσης βακτηρίων ήταν σημαντικά αυξημένη στη διάρκεια της αμέσως μετά τον τοκετό περιόδου. Σε προηγούμενη κλινική μελέτη, βρέθηκε ότι και η εκδήλωση κλινικής μαστίτιδας ήταν αυξημένη στην αμέσως μετά τον τοκετό περίοδο (Jones & Lanyon

1987). Με βάση τα ευρήματα του παρόντος πειραματισμού, μπορεί να υποθεθεί ότι η αυξημένη διάρκεια των συμπεριφορών "Προσπάθεια θηλασμού" και "Επιτυχής θηλασμός" στην αρχή της γαλακτικής περιόδου οδηγεί σε αυξημένη μόλυνση της θηλής. Οι υγιείς θηλές μπορεί να ανταπεξέλθουν στις μολύνσεις (Mavrogianni και συν. 2005, Mavrogianni, Cripps, Papaioannou και συν. 2006), όμως σε περιπτώσεις μειωμένης ανοσολογικής ανταπόκρισης, η οποία είναι συνήθης αμέσως μετά τον τοκετό (Walker 2000, Caroprese, Albenzio, Annicchiarico & Sevi 2006), οι μικροοργανισμοί μπορούν να παρακάμψουν τους αμυντικούς μηχανισμούς της θηλής. Έτσι εισέρχονται στο μαστικό παρέγχυμα και προκαλούν μαστίτιδα. Με βάση αυτήν την υπόθεση πιθανόν εξηγείται η αυξημένη πιθανότητα εκδήλωσης κλινικής μαστίτιδας μετά τον τοκετό.

Επίδραση του θηλασμού στη μετάδοση βακτηρίων στη θηλή των προβατίνων

Δυναμική της μόλυνσης

Στις αγελάδες η εσφαλμένη διαδικασία άρμεξης προδιαθέτει σε μαστίτιδα. Κατά την άρμεξη ο θηλαίος πόρος ανοίγει, οπότε η είσοδος των μικροοργανισμών και η άνοδος τους είναι εύκολη. Το στόμιο της θηλής παραμένει ανοικτό έως 2 h μετά την ολοκλήρωση της άρμεξης (McDonald 1975, Williams & Mein 1987), διευκολύνοντας έτσι την είσοδο βακτηρίων στη θηλή και κατ' επέκταση την εισβολή τους στο μαστικό αδέν. Αντίστοιχα αποτελέσματα έχουν αναφερθεί σε προβατίνες ύστερα από άρμεξη με τα χέρια (Mavrogianni, Cripps, Tzora και συν. 2006) ή με αρμεκτική μηχανή (Skoufos, Voidarou, Bezirtzoglou & Tzora 2006). Όμως, ο πιθανός ρόλος του θηλασμού στη μετάδοση βακτηρίων στη θηλή δεν έχει διερευνηθεί.

Στον πειραματισμό αυτόν εφαρμόστηκε μία μεθοδολογία (λήψη ζευγών δειγμάτων λίγο πριν και αμέσως μετά το θηλασμό), με την οποία μεσολαβούσε ελάχιστο χρονικό διάστημα μεταξύ δειγματοληψίας - θηλασμού - δειγματοληψίας. Έτσι διασφαλίστηκε ότι τα στελέχη που απομονώθηκαν αντανάκλυσαν την πραγματική δυναμική της μόλυνσης της θηλής κατά τη διάρκεια του θηλασμού.

Αμέσως μετά το θηλασμό, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των βακτηρίων στο θηλαίο πόρο, όχι όμως στο γάλα. Η μόλυνση της θηλής λάμβανε χώρα μόλις 1 min μετά την έναρξη του θηλασμού. Πάντως δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών διαφορετικών αλληλουχιών δειγματοληψίας ("B₁", B₂", "B₃"), είναι δε δυνατόν κάποια βακτήρια να εισήλθαν

στη θηλή και στη συνέχεια να απομακρύνθηκαν κατά τη διάρκεια του ίδιου επεισοδίου θηλασμού.

Περαιτέρω αν και υπήρχε συνεχής δυνατότητα για μόλυνση της θηλής, δεδομένου ότι τα αρνιά συνέχιζαν το θηλασμό τους στη διάρκεια των 120 min μεταξύ των δειγμάτων "B1" και "Γ", εντούτοις παρατηρήθηκε μείωση της μόλυνσης του θηλαίου πόρου. Αυτό υποδεικνύει ότι στις υγιείς θηλές η πλειονότητα των βακτηρίων δεν επιβίωσε για μεγάλο χρονικό διάστημα. Ο αμυντικός αυτός μηχανισμός αποσκοπεί στη μείωση των βακτηριακών πληθυσμών στη θηλή και συνεπώς ελαχιστοποιεί την πιθανότητα εκδήλωσης μαστίτιδας. Στις θηλές των αγελάδων έχουν περιγραφεί διάφοροι αμυντικοί μηχανισμοί, όπως η κηρώδους υφής κεράτινη στιβάδα στο θηλαίο πόρο, τα λευκοκύτταρα και διάφοροι άλλοι αντιμικροβιακοί παράγοντες (Nickerson 1987, Paulrud 2005).

Σε προηγούμενους πειραματισμούς (Mavrogianni και συν. 2005, Mavrogianni, Cripps, Papaioannou και συν. 2006), χρησιμοποιήθηκε η εναπόθεση βακτηρίων εντός της θηλής προκειμένου να μελετηθεί η αντίδραση του ζώου. Στον παρόντα πειραματισμό, η είσοδος των βακτηρίων στη θηλή κατά τη διάρκεια του θηλασμού αποτέλεσε "φυσική" μέθοδο ενοφθαλμισμού του θηλαίου πόρου. Άλλωστε, ακόμη και η φυσιολογική χλωρίδα της θηλής μπορεί να προκαλέσει μαστίτιδα εφόσον δημιουργηθούν αλλοιώσεις στη θηλή (Fragkou, Mavrogianni, Gougoulis & Fthenakis 2007). Τα ευρήματα της παρούσας έρευνας ενισχύουν την υπόθεση σχετικά με τον προστατευτικό ρόλο της υγιούς θηλής στην προβατίνα.

Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ προβατίνων που γαλουχούσαν μονόδυμα και δίδυμα αρνιά, ούτε μεταξύ των σταδίων της γαλακτικής περιόδου. Κατά τη διάρκεια του θηλασμού (δηλαδή στο χρονικό διάστημα μεταξύ των δειγμάτων "Α" και "Β") κάθε θηλή βρισκόταν εκτεθειμένη στον ίδιο κίνδυνο. Στις μεν προβατίνες με δίδυμα αρνιά κάθε αρνί θήλαζε μία συγκεκριμένη θηλή, στις δε προβατίνες με μονόδυμα αρνιά αυτό θήλαζε διαδοχικά και τις δύο θηλές. Συνεπώς, οι δύο θηλές βρίσκονταν σε ίδιο κίνδυνο για μόλυνση και συνακόλουθα δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ τους.

Μετάδοση Σταφυλοκόκκων και *M. haemolytica*

Στα πρόβατα, οι κυριότεροι από τους αιτιολογικούς παράγοντες μαστίτιδας είναι οι Σταφυλόκοκκοι και η *M. haemolytica*, που προκαλούν περισσότερο από 80% των περιστατικών (Bergonier, De Cremoux, Rupp, Lagriffoul & Berthelot 2003). Θεωρείται ότι οι Σταφυλόκοκκοι προέρχονται από τα χέρια των αρμεκτών ή από το δέρμα του μαστού (Marco Melero 1994, Bergonier & Berthelot 2003), εισέρχονται δε στη θηλή με τη διαδικασία της άρμεξης. Για τη *M.*

haemolytica έχει υποτεθεί (Scott & Jones 1998, Jones & Watkins 2000) ότι προέρχεται από τις αμυγδαλές και το ρινοφάρυγγα των αρνιών, αν και η υπόθεση αυτή δεν έχει αποδειχθεί.

Οι Σταφυλόκοκκοι μπορεί να προέρχονται από το δέρμα της θηλής ή από τα χείλη των αρνιών. Οι Laukova και Marounek (1992) απομόνωσαν πηκτάση-αρνητικούς Σταφυλόκοκκους από το ανώτερο τμήμα της πεπτικής οδού αρνιών, ενώ οι Vautor, Abadie, Guibert, Chevalier και Perin (2005) ανέφεραν την παρουσία Σταφυλοκόκκων στη ρινική κοιλότητα των προβάτων. Οι Σταφυλόκοκκοι είναι αιτιολογικοί παράγοντες μαστίτιδας σε προβατίνες κρεοπαραγωγικών φυλών (Jones & Lanyon 1987, Jones & Watkins 1998). Αφενός αποτελούσαν τους κύριους αιτιολογικούς παράγοντες υποκλινικής μαστίτιδας, αφετέρου δε απομονώνονταν συχνά από περιστατικά κλινικής μαστίτιδας. Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώνουν τη μετάδοση αυτών των μικροοργανισμών στη διάρκεια του θηλασμού και εξηγούν τη μετάδοσή τους σε προβατίνες κρεοπαραγωγικών φυλών, όπου η θηλή δεν έρχεται σε επαφή με τα χέρια.

M. haemolytica απομονώθηκε από υλικό θηλαίου πόρου αποκλειστικά μετά το θηλασμό. Μάλιστα, ο μικροοργανισμός δεν είχε απομονωθεί από το ίδιο σημείο δευτερόλεπτα μόλις πριν το θηλασμό. Αυτό αποτελεί σαφή απόδειξη ότι το βακτήριο μεταδόθηκε από τα αρνιά στο θηλαίο πόρο. Επιπλέον, λαμβάνοντας υπόψη τα ευρήματα των Al-Sultan και Aitken (1984) σχετικά με την ύπαρξη *M. haemolytica* στις αμυγδαλές και το ρινοφάρυγγα κλινικά υγιών αρνιών (έως και στο 100% των ζώων μίας εκτροφής), γίνεται σαφές ότι η πηγή των μικροοργανισμών που απομονώθηκαν, ήταν το ανώτερο τμήμα της αναπνευστικής οδού των αρνιών. Σημειώνεται ότι πέραν των ευρημάτων που παρουσιάζονται στο Κεφάλαιο III, απομονώθηκε *M. haemolytica* από τις αμυγδαλές των αρνιών των δύο προβατίνων, από το θηλαίο πόρο των οποίων απομονώθηκε το βακτήριο. Στη συνέχεια και χρησιμοποιώντας μοριακές τεχνικές, επιβεβαιώθηκε η ομοιότητα των δύο στελεχών (Τα αποτελέσματα αυτά δεν αποτελούν τμήμα της παρούσας διατριβής). Έτσι, με όλα αυτά τα ευρήματα επιβεβαιώνεται η μετάδοση *M. haemolytica* από τα αρνιά στις προβατίνες κατά το θηλασμό..

Όσον αφορά στον ακριβή μηχανισμό της μετάδοσης, μπορεί να θεωρηθεί ότι καθώς το άκρο της θηλής έρχεται σε επαφή με το φάρυγγα των αρνιών (Titchen 1977), τα βακτήρια προσκολλώνται στη θηλή και εισέρχονται στο θηλαίο κόλπο πιθανόν υποβοηθούμενα και από την πίεση της γλώσσας. Η απομόνωση του μικροοργανισμού έπειτα από ένα σύντομο επεισόδιο θηλασμό (1 min) αποδεικνύει την ταχύτητα με την οποία λαμβάνει χώρα η μετάδοση του μικροοργανισμού. Οι Vilela, Fitzpatrick και Morgan (2004) ανέφεραν ότι προκειμένου να προκληθεί μαστίτιδα από *M. haemolytica*, είναι απαραίτητη η προσκόλλησή της στα μαστικά επιθηλιακά κύτταρα. Έτσι, η ίδια η διαδικασία του θηλασμού (στο ίδιο ή σε επόμενο επεισόδιο)

μπορεί στη συνέχεια να απομακρύνει από τη θηλή βακτήρια που δεν έχουν ακόμα προσκολληθεί.

Πάντως αν και όπως φαίνεται όλες οι γαλουχούσες προβατίνες βρίσκονται σε κίνδυνο μόλυνσης από το συγκεκριμένο μικροοργανισμό, εν τούτοις το ποσοστό κλινικής μαστίτιδας από *M. haemolytica* δεν υπερβαίνει το 5% (Jones & Lanoyon 1987). Αυτό πιθανόν οφείλεται σε διαφορές μεταξύ των λοιμογόνων χαρακτηριστικών των στελεχών, καθώς και σε ατομικές διαφορές μεταξύ ζώων στην αμυντική ικανότητα της θηλής τους.

Συνέπειες της υποκλινικής μαστίτιδας στη συμπεριφορά θηλασμού

Η μείωση της παραγωγής γάλακτος ως αποτέλεσμα της υποκλινικής μαστίτιδας οφείλεται στην καταστροφή των δομικών στοιχείων του μαστικού αδένα από τον εισβάλλοντα μικροοργανισμό (Fthenakis & Jones 1990β). Στην παρούσα μελέτη επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη υποκλινικής μαστίτιδας στις προβατίνες με βάση τα βακτηριολογικά, κυτταρολογικά και ιστοπαθολογικά ευρήματα. Τα αποτελέσματα αποδεικνύουν επίσης σαφώς ότι σε περίπτωση υποκλινικής μαστίτιδας μεταβάλλονται τα πρότυπα συμπεριφοράς της προβατίνας και του αρνιού της. Τέτοια ευρήματα δεν είχαν αναφερθεί έως τώρα.

Αν και στη παρούσα μελέτη δε μελετήθηκαν παράμετροι που σχετίζονταν απευθείας με την αξιολόγηση του πόνου, εν τούτοις κάποιες μεταβολές στη συμπεριφορά των προβατίνων θα μπορούσαν να ερμηνευτούν ότι υποδείκνυαν αυξημένη δυσφορία. Αυτές περιλαμβάνουν την αυξημένη συχνότητα "Βελασμάτων" και "Όρθιας στάσης με έκταση της κεφαλής", δηλαδή συμπεριφορών που θεωρούνται ως "πρόσκληση" από πλευράς προβατίνας προς το αρνί της για να θηλάσει (Pickup και Dwyer 2001, 2002). Αυτές οι μεταβολές στη συμπεριφορά των ζώων θα μπορούσαν να ερμηνευτούν ότι πιθανόν αντικατοπτρίζουν προβλήματα ευζωίας των προβατίνων με υποκλινική μαστίτιδα.

Ο Ewbank (1967) και οι Hess και συν. (1974) ανέφεραν ότι τα μονόδυμα αρνιά δεν παρουσίαζαν προτίμηση θηλασμού σε συγκεκριμένο μαστικό αδένα. Αυτό επιβεβαιώθηκε από τη συμπεριφορά των αρνιών της ομάδας Β, καθώς και τη συμπεριφορά των αρνιών της ομάδας Α πριν τον ενοφθαλμισμό των προβατίνων. Στη συνέχεια όμως, η συμπεριφορά των αρνιών της ομάδας Α μεταβλήθηκε. Τα αρνιά εκδήλωσαν σημαντική αύξηση της συχνότητας θηλασμού του υγιούς αδένα. Σε γενικές γραμμές, η συχνότητα και η διάρκεια του θηλασμού ήταν ανάλογες προς την παραγωγή γάλακτος από τους υγιείς και τους ενοφθαλισμένους αδένες.

Μάλιστα, αυτή η μεταβολή της συμπεριφοράς παρατηρήθηκε ήδη την τρίτη ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό. Προφανώς, τα αρνιά αναγνώρισαν σύντομα ότι ο ενοφθαλισμένος αδένας

δεν μπορούσε να καλύψει τις ανάγκες τους. Είναι επίσης πιθανόν η υφάλμυρη γεύση του εκκρίματος των μαστικών αδένων με υποκλινική μαστίτιδα (Oliveira, Fernandes, Neto, Fonseca, Silva & Balian 2002) να έχει συμβάλει στη μεταβολή της συμπεριφοράς των αρνιών. Η μεταβολή στη συμπεριφορά "Προσπάθεια θηλασμού" υποδεικνύει ότι τα αρνιά "κατόνησαν" τη διαφορά στην παραγωγή γάλακτος μεταξύ των δύο αδένων της προβατίνας, και γι' αυτό θήλαζαν πιο συχνά τον υγιή αδένα.

Όμως δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στη συχνότητα και στη διάρκεια της συμπεριφοράς "Επεισόδιο θηλασμού" μεταξύ των αρνιών των δύο ομάδων. Ένα "Επεισόδιο θηλασμού" περιλαμβάνει συνολικά προσπάθειες θηλασμού και επιτυχείς θηλασμούς που πραγματοποιούνται από τα αρνιά και στους δύο μαστικούς αδένες. Έτσι λοιπόν, μπορεί να θεωρηθεί ότι τα αρνιά και των δύο ομάδων κατανάλωσαν τελικά παρόμοια ποσότητα γάλακτος, δεδομένου άλλωστε ότι δεν παρατηρήθηκε διαφορά στη συνολική παραγωγή γάλακτος από τις προβατίνες των ομάδων Α και Β. Έτσι η υπόθεση αυτή επιβεβαιώνεται και από τον όμοιο ρυθμό ανάπτυξης στα αρνιά των δύο ομάδων.

Επίλογος

Συμπεράσματα

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

(α) Παρατηρήθηκαν κάποιες διαφορές στα πρότυπα συμπεριφοράς θηλασμού των ζώων μίας φυλής προβάτων γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης, από αυτά που αναφέρονται στη βιβλιογραφία για πρόβατα κρεοπαραγωγικών φυλών.

- Οι προβατίνες γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης δεν μπορούν να χαρακτηριστούν ως "κακές" μητέρες.
- Οι προβατίνες γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης αφιέρωναν μειωμένο χρόνο περιποίησης στα νεογέννητα αρνιά αμέσως μετά τον τοκετό. Αυτό πιθανόν συμβάλλει

- στη μειωμένη συχνότητα των αναπνευστικών συνδρόμων στις εκτροφές προβάτων στην Ελλάδα.
- Οι προβατίνες επιδιώκουν τον τερματισμό ενός "Επεισοδίου θηλασμού" όταν ο μαστικός αδένας κενώνεται. Έτσι αποφεύγεται ο τραυματισμός της θηλής και συνακόλουθα η εκδήλωση μαστίτιδας.
 - Η αυξημένη συχνότητα και διάρκεια των επεισοδίων θηλασμού στην αρχή της γαλακτικής περιόδου, πιθανόν οδηγεί σε αυξημένη συχνότητα απομόνωσης βακτηρίων από το μαστικό αδένες των προβατινών.
 - Προβατίνες με επαρκή παραγωγή γάλακτος μπορούν να αρμέγονται ακόμη και πριν την απομάκρυνση των αρνιών τους.
 - Ο θηλασμός από δίδυμα αρνιά δε φαίνεται ότι προκαλεί αυξημένη συχνότητα μόλυνσης της θηλής και του μαστικού αδένος.
- (β) Κατά τη διάρκεια του θηλασμού μεταδίδονται βακτήρια από τα αρνιά στις προβατίνες.
- Ο θηλασμός αυξάνει την πιθανότητα μόλυνσης του θηλαίου πόρου.
 - Συγκεκριμένα, μεταδίδονται *M. haemolytica* και Σταφυλόκοκκοι από τη στοματική κοιλότητα των αρνιών στις θηλές των προβατινών.
 - Ωστόσο, οι υγιείς θηλές μπορούν να αποτρέψουν τη μόλυνση του σύστοιχου μαστικού αδένος.
- (γ) Η υποκλινική μαστίτιδα οδηγεί σε μεταβολή της συμπεριφοράς θηλασμού των αρνιών.
- Εξαιτίας της μείωσης της παραγωγής γάλακτος μεταβάλλεται η συμπεριφορά των αρνιών, που θηλάζουν συχνότερα τον υγιή αδένος.
 - Σε περιπτώσεις μονόδυμων αρνιών, η αύξηση του βάρους τους δεν επηρεάζεται.
- (δ) Συνιστάται η αξιολόγηση της υγείας του μαστικού αδένος σε κάθε μελέτη συμπεριφοράς θηλασμού σε πρόβατα. Έτσι θα αποφεύγονται πιθανά λάθη και αντικρουόμενα αποτελέσματα σε διαφορετικές μελέτες.

Προοπτικές

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

- Έλεγχος της υπόθεσης, με την οποία συσχετίζεται ο μειωμένος χρόνος περιποίησης των νεογέννητων αρνιών με τη μειωμένη συχνότητα των αναπνευστικών συνδρόμων.
- Αξιολόγηση των συνεπειών της άρμεξης προβατινών με επαρκή παραγωγή γάλακτος πριν τον αποθηλασμό των αρνιών τους.

- Μελέτη της μοριακής συγγένειας στελεχών βακτηρίων (ιδιαίτερα *M. haemolytica*) από τη θηλή και από τη στοματική κοιλότητα των αρνιών.
- Μελέτη της επίδρασης της υποκλινικής μαστίτιδας στις προβατίνες που θηλάζουν δίδυμα αρνιά.
- Αξιολόγηση της πιθανής μετάδοσης βακτηρίων από προβατίνες με υποκλινική μαστίτιδα σε υγιή ζώα, μέσω "διασταυρούμενου" θηλασμού.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

- Μαυρογιάννη ΒΣ (2006). *Προστατευτικός Ρόλος της Θηλής και Σημασία των Παθήσεών της στην Εκδήλωση Μαστίτιδας από Mannheimia haemolytica σε Πρόβατα*. Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- Τσακάλωφ Π (1998) *Μαιευτική των Κατοικίδιων Θηλαστικών*, 2η εκδ. Υπηρεσία Δημοσιευμάτων ΑΠΘ, Θεσσαλονίκη
- Al-Sultan II, Aitken ID (1984). The tonsillar carriage of *Pasteurella haemolytica* in lambs. *Journal of comparative Pathology* 95:193-201.
- Alexander G, Shillito EE (1977). The importance of odour, appearance and voice in maternal recognition of the young in Merino sheep (*Ovis aries*). *Applied Animal Ethology* 3:127-135.
- Alexander G, Shillito EE (1978). Maternal responses in Merino ewes to artificially coloured lambs. *Applied Animal Behaviour Science* 4:141-152.
- Alexander G, Stevens D (1981). Recognition of washed lambs by Merinos ewes. *Applied Animal Ethology* 7:77-86.
- Alexander G, Stevens D, Kilgour R, de Langen H, Motterhead BE, Lynch JJ, (1983). Separation of ewes from twin lambs: incidence in several sheep breeds. *Applied Animal Ethology* 10:301-317.
- Alexander G, Williams D (1966). Teat-seeking activity in lambs during the first hours of life. *Animal Behaviour* 14:166-176.
- Arnold GW, Morgan PD (1975). Behaviour of the ewe and lamb at lambing and its relationship to lamb mortality. *Applied Animal Ethology* 2:25-46.
- Atroshi F, Osterberg S (1979). The behaviour of Finnsheep during and shortly after lambing. *Acta Agriculturae Scandinavica* 29:258-162.
- Bareham JR (1975). The effect of lack of vision on suckling behaviour of lambs. *Applied Animal Ethology* 1:245-250.
- Bareham JR (1976). The behaviour of lambs on the first day after birth. *British Veterinary Journal* 132:152-162.
- Barrow GI, Feltham RKA (1993). *Manual for the Identification of Medical Bacteria*, 3rd edn. Cambridge University Press, Cambridge.
- 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.
- Billing AE, Vince M (1987 α). Teat-seeking behaviour in newborn lambs. I. Evidence for the influence of maternal skin temperature. *Applied Animal Behaviour Science* 18:310-313.
- Billing AE, Vince M (1987 β). Teat-seeking behaviour in newborn lambs. II. Evidence for the influence of the dam's surface texture and degree of surface yield. *Applied Animal Behaviour Science* 18:315-325.
- Booth KK (2006). The significance of the vomeronasal organ for offspring recognition in sheep. *Small Ruminant Research* 62:39-41.
- Booth KK, Katz LS (2000). Role of the vomeronasal organ in neonatal offspring recognition in sheep. *Biology of Reproduction* 63:953-958.
- Boyazoglu J, Morand-Fehr P (2001). Mediterranean dairy sheep and goat products and their quality. A critical review. *Small Ruminant Research* 40:1-11.
- Broad KD, Levy F, Evans G, Kimura T, Keverne EB, Kendrick KM (1999). Previous maternal experience potentiates the effect of parturition on oxytocin receptor mRNA expression in the paraventricular nucleus. *European Journal of Neuroscience* 11:3725-3737.
- Caba M, Poindron P, Krehbiel D, Levy F, Romeyer A, Venier G (1995). Naltrexone delays the onset of maternal behavior in primiparous parturient ewes. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour* 52:743-748.
- Caroprese M, Albenzio M, Annicchiarico G, Sevi A (2006). Changes occurring in immune responsiveness of single- and twin-bearing Comisana ewes during the transition period. *Journal of Dairy Science* 89:562-568.
- Caroprese M, Sevi A, Schena L, Annicchiarico G, Muscio A (2005). Immune response of single and twin lambed Comisana-breed ewes during the transition period. *Proceedings of the 6th International Sheep Veterinary Congress, Hersonissos, Greece*, pp. 156-157.
- 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.
- Christodouloupoulos G, Warnick LD, Papaioannou N, Fthenakis GC (2002). Tilmicosin administration to young lambs with respiratory infection: safety and efficacy considerations. *Journal of veterinary Pharmacology and Theriogenology* 25:393-397.
- Cloete SWP, Olivier JJ, Schlotz AJ, ten Hoop JM, Lombard PJA, Franken MC (1998). Ease of

- birth in relation to pelvic dimensions, litter weight and conformation in sheep. *Small Ruminant Research* 31:51-60.
- Cloete SWP, Scholtz AJ, Gilmour AR, Olivier JJ (2002). Genetic and environmental effects on lambing neonatal behaviour of Dorper and SA Mutton Merino lambs. *Livestock Production Science* 78:183-193
- Dwyer CM (2003). Behavioural development in the neonatal lamb: effect of maternal birth-related factors. *Theriogenology* 59:1027-1050.
- Dwyer CM, Calvert SK, Farish M, Donbav J, Pickup HE (2005). Breed, litter and parity effects on placental weight placentome number and consequences for the neonatal behaviour of the lamb. *Theriogenology* 63:1092-1110
- Dwyer CM, Dingwall WS, Lawrence AB (1999). Physiological correlates of maternal-offspring behaviour in sheep: a factor analysis. *Physiology & Behavior* 67:443-454.
- Dwyer CM, Gilbert CL, Lawrence AB (2004). Prepartum plasma estradiol and postpartum cortisol, but not oxytocin, are associated with interindividual and breed differences in the expression of maternal behaviour in sheep. *Hormones and Behavior* 46:529-543.
- Dwyer CM, Lawrence AB (1998). Variability in the expression of maternal behaviour in primiparous sheep: effects of genotype and litter size. *Applied Animal Behaviour Science* 58:311-330.
- Dwyer CM, Lawrence AB (1999). Does the behaviour of the neonate influence the expression of maternal behaviour in sheep? *Behaviour* 136:367-389.
- Dwyer CM, Lawrence AB (2000). Maternal behaviour in domestic sheep (*Ovis Aries*): constancy and change with maternal experience. *Behaviour* 137:1391-1413.
- Dwyer CM, Lawrence AB, Bishop SC (2001). The effects of selection for lean tissue content on maternal and neonatal lamb behaviours in Scottish Blackface sheep. *Animal Science* 2:555-571.
- Dwyer CM, Lawrence AB, Bishop SC, Lewis M (2003). Ewe-lamb bonding behaviours at birth are affected by maternal undernutrition in pregnancy. *British Journal of Nutrition* 89:123-136.
- Dwyer CM, Lawrence AB, Brown HE, Simm G (1996). Effect of ewe and lamb genotype on gestation length, lambing ease and neonatal behaviour of lambs. *Reproduction Fertility Development* 8:1123-1129.
- Dwyer CM, McLean KA, Dean LA, Chirnside J, Calvert SK Lawrence AB (1998). Vocalisations between mother and young in sheep: effects of breed and maternal experience. *Applied Animal Behaviour Science* 58:105-119.

- 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; last full update September 07, 2006. URL: <http://www.bacterio.net>).
- Ewbank R (1964). Observation on the suckling habits of twin lambs. *Animal Behaviour* 12:34-37.
- Ewbank R (1967). Nursing and suckling behaviour amongst Clun-Forest ewe-lambs. *Animal Behaviour* 15:251-258.
- Ewbank R, Mason AC (1967). A note on the sucking behaviour of the twin lambs reared as single. *Animal Production* 9:417-420.
- Fahmy MH, Roberts S, Castonguay F (1997). Ewe lamb behaviour at parturition in prolific and non-prolific sheep. *Canadian Journal of Animal Science* 77:9-15.
- Ferreira G, Gervais R, Durkin TP, Levy F (1999). Post-acquisition scopolamine treatments reveal the time course for the formation of lamb odor recognition memory in parturient ewes. *Behavioral Neuroscience* 113:136-142.
- Ferreira G, Terrazas A, Poindron P, Nowak R, Orgeur P, Levy F (2000). Learning of olfactory cues is not necessary for early lamb recognition by the mother. *Physiology & Behavior* 69:405-412.
- Fitzpatrick J, Scott M, Nolan A (2006). Assessment of pain and welfare in sheep. *Small Ruminant Research* 62:55-61.
- Fragkou IA, Mavrogianni VS, Gougoulis DA, Fthenakis GC (2007). The bacterial flora in the teat duct of ewes can prevent from and can cause mastitis. *Veterinary Research*, in press.
- Fthenakis GC (1988). *Ovine Mastitis with Special Reference to Subclinical Mastitis associated with Coagulase-Negative Staphylococci*. Ph.D. thesis, The Royal Veterinary College, University of London.
- Fthenakis GC (1995). California Mastitis Test and Whiteside Test in diagnosis of subclinical mastitis of dairy ewes. *Small Ruminant Research* 16:271-276.
- Fthenakis GC, Jones JET (1990 α). The effect of experimentally induced subclinical mastitis on milk yield of ewes and on the growth of lambs. *British Veterinary Journal* 146:43-49.
- Fthenakis GC, Jones JET (1990 β). The effect of inoculation of coagulase-negative staphylococci into the ovine mammary gland. *Journal of Comparative Pathology* 102:211-219.

- George JM (1969). Variation in the time of parturition of Merino and Dorset Horn ewes. *Journal of agricultural Science, Cambridge* 73:295-299.
- Gonyou HW, Stookey JM (1983). Use of lambing cubicles and the behaviour of ewes at parturition. *Journal of animal Science* 56:787-791.
- Gonyou HW, Stookey JM (1987). Maternal and neonatal behaviour. *Veterinary Clinic of North America - Food Animal Practice* 3:231-249.
- Gonzalez SG, Goddard PJ (1998). The provision of supplementary colostrum to newborn lambs: effects on post natal lamb and ewe behaviour. *Applied Animal Behaviour Science* 61:41-50.
- Gordon K, Siegmann M (1991). Suckling behaviour of ewes in early lactation. *Physiology & Behavior* 50:1079-1081.
- Goursaud AP, Nowak R (1999). Colostrum mediates the development of mother preference by newborn lambs. *Physiology & Behavior* 67:49-56.
- Haenlein GFW (2001). Past, present, and future perspectives of small ruminant dairy research. *Journal of Dairy Science* 84:2097-2115.
- Haenlein GFW, Abdellatif MA (2004). Trends in small ruminant husbandry and nutrition and specific reference to Egypt. *Small Ruminant Research* 51:185-200.
- Haughey KG (1991). Perinatal lamb mortality-its investigation, causes and control. *Journal of South Africa veterinary Association* 62:78-91.
- Henderson DC (2000). Neonatal conditions. In: WB Martin, ID Aitken (eds) *Diseases of Sheep*, 3rd edn. Blackwell, Oxford, pp. 58-65.
- Hernez H, Serafin N, Terrazas AM, Marnet PG, Kann G, Delgadillo JA, Poindron P (2002). Maternal olfaction differentially modulates oxytocin and prolactin release during suckling in goats. *Hormones and Behavior* 42:232-244.
- Hess CE, Graves HB, Wilson LL (1974). Individual preweaning suckling behavior of single, twin and triplet lambs. *Journal of animal Science* 38:1313-1318.
- Hinch GN (1989). The sucking behaviour of triplet, twin and single lambs at pasture. *Applied Animal Behaviour Science* 22:39-48.
- Holmes RJ (1976). Relationship of parturient behaviour to reproductive efficiency of Finn Sheep. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* 36:253-257.
- Houdijk JGM, Kyriazakis I, Jackson F, Huntley JF, Coop RL (2003). Is the allocation of metabolisable protein prioritised to milk production rather than to immune functions in *Teladorsagia circumcincta*-infected lactating ewes? *International Journal of Parasitology* 33:327-338.

- Jones JET (1991). Mastitis in sheep. In: JB Owen, RFE Axford (eds) *Breeding for Disease Resistance in Farm Animals*. CAB International, Wallingford, pp. 412-423.
- Jones JET, Lanyon ME (1987). An investigation of ovine mastitis in England and Wales: preliminary results. *Proceedings of Annual Meeting of Association of Veterinary Teachers and Research Workers*, Scarborough, Great Britain, pp. (1) 21-22.
- Jones JET, Watkins GH (1998). Studies on mastitis in sheep at the Royal Veterinary College. *Proceedings of Sheep Veterinary Society* 22:83-90.
- Jones JET, Watkins GH (2000). In: WB Martin, ID Aitken (eds) *Diseases of Sheep*, 3rd edn. Blackwell, Oxford, pp. 75-80.
- Kaasschieter GA, Dejong R, Schiere JB, Zwart D (1992). Towards a sustainable livestock production in developing countries and the importance of animal health strategy therein. *Veterinary Quarterly* 14:66-75
- Kalinowska C, Golubinska B, Dolinska RM (1985). Effect of a positive CMT in milk of Marsh ewes on growth and survival of lambs. *Medycyna Weterynaryjna* 41:501-503.
- Keisler DH, Andrews ML, Moffatt RJ (1992). Subclinical mastitis in ewes and its effect on lamb performance. *Journal of animal Science* 70:1677-1681.
- Keller M, Meurisse M, Poindron P, Nowak R, Ferreira G, Shayit M, Levy F (2003). Maternal experience influences the establishment of visual/auditory, but not olfactory recognition of the newborn lamb by ewes at parturition. *Developmental Psychobiology* 43:167-176.
- Kendrick KM (2000). Oxytocin, motherhood and bonding. *Experimental Physiology* 85:111-124.
- Kendrick KM, Da Costa APC, Broad KD, Ohkura S, Guevara R, Levy F, Keverne EB (1997). Neural control of maternal behaviour and olfactory recognition of offspring. *Brain Research Bulletin* 44:383-395.
- Kendrick KM, Keverne EB (1991). Importance of progesterone and estrogen priming for the induction of maternal behavior by vaginocervical stimulation in sheep: effects of maternal experience. *Physiology & Behavior*, 49:745-750.
- Kendrick KM, Keverne EB, Hinton MR, Goode JA (1991). Cerebrospinal fluid and plasma concentrations of oxytocin and vasopressin during parturition and vaginocervical stimulation in the sheep. *Brain Research Bulletin* 26:803-807.
- Kendrick KM, Levy F, Keverne EB (1991). Importance of vaginocervical stimulation for the formation of maternal bonding in primiparus and multiparous parturient ewes. *Physiology & Behavior* 50:595-600.

- Keverne EB (1999). The vomeronasal organ. *Science* 286:716-720.
- Keverne EB, Kendrick KM (1991). Morphine and corticotrophin-releasing factor potentiate maternal acceptance in multiparous ewes after vaginocervical stimulation. *Brain Research* 540:55-62.
- Keverne EB, Kendrick KM (1994). Maternal behaviour in sheep and its neuroendocrine regulation. *Acta Paediatrica* 397 (Supplement):47-56.
- Kuchel RC, Lindsay DR (1999). Maternal behaviour and the survival of lambs in superfine wool sheep. *Reproduction Fertility and Development* 11:391-394.
- Laukova A, Marounek M (1992). Physiological and biochemical characteristics of staphylococci isolated from the rumen of young calves and lambs. *Zentralblatt fur Mikrobiologie* 147:489-494.
- Las Heras A, Dominguez L, Fernandez-Garayzabal JF (1999). Prevalence and etiology of subclinical mastitis in dairy ewes of the Madrid region. *Small Ruminant Research* 32:21-29.
- Le Neidre P (1989). Influence of cattle rearing conditions and breed on social relationship of mother and young. *Applied Animal Behaviour Science* 23:117-127.
- Levy F, Gervais R, Kindermann U, Litterio M, Poindron P, Porter R (1991). Effects of early post-partum separation on maintenance of maternal responsiveness and selectivity in parurient ewes. *Applied Animal Behaviour Science* 31:101-110.
- Levy F, Guevara-Guzman R, Hinton MR, Kendrick KM, Keverne EB (1993). Effects of parturition and maternal experience on noradrenaline and acetylcholine release in the olfactory bulb of sheep. *Behavioral Neuroscience* 107:662-668.
- Levy F, Keller M, Poindron P (2004). Olfactory regulation of maternal behavior in mammals. *Hormones and Behavior* 46:284-302.
- Levy F, Kendrick KM, Goode JA, Guevara-Guzman R, Keverne EB (1995). Oxytocin and vasopressin release in the olfactory bulb of parturient ewes: changes with maternal experience and effects on acetylcholine, gamma-aminobutyric acid, glutamate and noradrenaline release. *Brain Research* 669:197-206.
- Levy F, Kendrick KM, Keverne EB, Piketty V, Poindron P (1992). Intracerebral oxytoxin is important for the onset of maternal behaviour in inexperienced ewes delivered under peridural anaesthesia. *Behavioral Neuroscience* 106:427-432.
- Levy F, Locatelli A, Piketty V, Tillet Y, Poindron P (1995). Involvement of the main but not the accessory olfactory system in maternal behavior of primiparous and multiparous ewes. *Physiology & Behavior* 57:97-104.

- Levy F, Poindron P (1987). The importance of amniotic fluids for the establishment of maternal behaviour in experienced and inexperienced ewes. *Animal Behaviour* 35:1188-1192.
- Levy F, Poindron P, Le Neindre P (1983). Attraction and repulsion by amniotic fluids and their olfactory control in the ewe around parturition. *Physiology & Behavior* 31:687-692.
- McDonald JS (1975). Radiographic method for anatomic study of the teat canal changes between milking periods. *American Journal of veterinary Research* 36:1241-1242.
- McGlone JJ, Stobart RH (1986). A quantitative ethogram of behaviour of yearling ewes during two hours post-parturition. *Applied Animal Behaviour Science* 16:157-164.
- Marco Melero JC (1994). *Mastitis in Laxta Breed Sheep: Epidemiology, Diagnosis and Control*. Ph.D thesis, University of Zaragoza.
- Margetin M, Capistrak A, Kica J, Valkovsky P, Foltys V (1994). Somatic cell count, production and milk composition in sheep to weaning of lambs and after it. *Proceedings of International Symposium on Somatic Cells in the Milk of Small Ruminants*, Bella, Italy, pp. 199-202.
- Martin SW, Meek AH, Willenberg P (1987). *Veterinary Epidemiology. Principles and Methods*. Iowa State University Press, Ames.
- 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, Cripps PJ, Tzora A, Skoufos I, Fthenakis GC (2006). Effects of hand milking on the bacterial flora of mammary gland and teat duct of ewes. *Journal of Dairy Research* 73:353-356.
- Mavrogianni VS, Fthenakis GC (2005). Efficacy of difloxacin against respiratory infections of lambs. *Journal of veterinary Pharmacology and Therapeutics* 28:325-328.
- 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.
- Menzies PI (1997). Reproductive health management programs. In: RS Youngquist (ed) *Current*

- Therapy in Large Animal Theriogenology*. Saunders, Philadelphia, pp. 643-649.
- Meunier-Salaun MC, Gort F, Prunier A, Schouten WPG (1991). Behavioural patterns and progesterone, cortisol and prolactin levels around parturition in European (Large-White) and Chinese (Meishan) sows. *Applied Animal Behaviour Science* 31:43-59.
- Meurisse M, Gonzalez A, Delsol G, Caba M, Levy F, Poindron P (2005). Estradiol receptor-alpha expression in hypothalamic and limbic regions of ewes is influenced by physiological state and maternal experience. *Hormones and Behavior* 48:34-43.
- Miles AA, Misra JS (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *Journal of Hygiene, Cambridge* 38:732-749.
- Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (1986). *Manual of Veterinary Parasitological Techniques*, HMSO, London.
- Munro J (1956). Observation on the suckling behaviour of young lambs. *British Journal of animal Behaviour* 4:34-36.
- Napolitano F, Annicchiarico G, Caroprese M, De Rosa G, Taibi L, Sevi A (2003). Lambs prevented from suckling their mothers display behavioural, immune and endocrine disturbances. *Physiology & Behavior* 78:81-89.
- Nickerson SC (1987). Resistance mechanisms of the bovine udder: new implications for mastitis control at the teat end. *Journal of American veterinary medical Association* 191:1484-1488.
- Noakes DE (2001). Pregnancy and its diagnosis. In: DE Noakes, TJ Parkinson, GCW England, GH Arthur (eds) *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*, 8th edn. Saunders, Edinburgh, pp. 69-118.
- Nowak R (1990). Mother and sibling discrimination at a distance by three- to seven-day-old lambs. *Developmental Psychobiology* 23:285-295.
- Nowak R (1995). Lambs' attachment to their mother: importance of the first sucking bouts. *Applied Animal Behaviour Science* 44:257-283.
- Nowak R (1996). Neonatal survival: contribution from behavioural studies in sheep. *Applied Animal Behaviour Science* 49:61-72.
- Nowak R, Breton G, Mellot E (2001). CCK and development of mother preference in sheep: a neonatal time course study. *Peptides* 22:1309-1316.
- Nowak RF, Lindsay DR (1992). Discrimination of Merino ewes by their newborn lambs: important for survival? *Applied Animal Behaviour Science* 34:61-74.
- Nowak R, Murphy TM, Lindsay DR, Alster P, Andersson R, Uvnas-Moberg K (1997). Development of a preferential relationship with the mother by the newborn lamb: importance

- of the sucking activity. *Physiology & Behavior* 62:681-688.
- Nowak R, Poindron P (2006). From birth to colostrum: early steps leading to lamb survival. *Reproduction Nutrition Development* 46:431-446.
- Nowak R, Porter RH, Levy F, Orgeur P, Schaal B (2000). Role of mother-young interactions in the survival of offspring in domestic mammals. *Reviews of Reproduction* 5:153-163.
- O'Connor CE, Lawrence AB, Woodgush DGM (1992). Influence of litter size and parity on maternal behaviour at parturition in Scottish Blackface sheep. *Applied Animal Behaviour Science* 33:345-355.
- Oliveira CAF, Fernandes AM, Neto OCC, Fonseca LFL, Silva EOT, Balian SC (2002). Composition and sensory evaluation of whole yoghurt produced from milk with different somatic cell counts. *Australian Journal of Dairy Technology* 57:192-196.
- Orihuela A, Suarez E, Vazquez R (2004). Effect of restricting suckling on the social bond between ewes and their 10-week-old lambs. *Livestock Production Science* 87:259-264.
- Owens JL, Bindon BM, Edey TN, Piper LR (1985). Behaviour at parturition and lamb survival of Booroola Merino sheep. *Livestock Production Science* 13:359-372.
- Paulrud CO (2005). Basic concepts of the bovine teat canal. *Veterinary Research Communications* 29:215-245.
- Pickup HE, Dwyer CM (2001). Does variation in the onset of maternal behaviour affect the strength of association between ewes and their lambs? *Proceedings of 35th International Congress of the International Society for Applied Ethology*, California, USA, p. 95.
- Pickup HE, Dwyer CM (2002). Breed differences in the expression of maternal care at parturition persist throughout the lactation period in sheep. *Proceedings of the British Society of Animal Science*, York, England, p. 70.
- Pissonnier D, Thiery JC, Fabre-Nys C, Poindron P, Keverne EB (1985). The importance of olfactory bulb noradrenalin for maternal recognition in sheep. *Physiology & Behavior* 35:361-362.
- Poindron P (2005). Mechanisms of activation of maternal behaviour in mammals. *Reproduction Nutrition Development* 45:341-351.
- Poindron P, Gilling G, Hernez H, Serafin N, Terrazas A (2003). Early recognition of newborn goat kids by their mother: I. Non-olfactory discrimination. *Developmental Psychobiology* 43:82-89.
- Poindron P, Le Neindre P (1980). Endocrine and sensory regulation of maternal behavior in the

- ewe. *Advances in the Study of Behavior* 11:75-119.
- Poindron P, Le Neindre P, Raksanyi I, Trillat G, Orgeur P (1980). Importance of the characteristics of the young in the manifestation and establishment of maternal behaviour in sheep. *Reproduction Nutrition Development* 20:817-826.
- Poindron P, Levy F, Krehbiel D (1988). Genital, olfactory, and endocrine interactions in the development of maternal behaviour in the parturient ewe. *Psychoneuroendocrinology* 13:99-125
- Poindron P, Martin GB, Hooley RD (1979). Effects of lambing induction on the sensitive period for the establishment of maternal behaviour in sheep. *Physiology & Behavior* 23:1081-1087.
- Poindron P, Nowak R, Levy F, Porter RH, Schaal B (1993). Development of exclusive mother-young bonding in sheep and goats. *Oxford Reviews of reproductive Biology* 15:311-364.
- Poindron P, Orgeur P, Le Neindre P, Kann G, Raksanyi I (1980). Influence of the blood concentration of prolactin on the length of the sensitive period for the establishing maternal behaviour in sheep at parturition. *Hormones and Behavior* 14:173-177.
- Poindron P, Rempel N, Troyer A, Krehbiel D (1989). Genital stimulation facilitates maternal behavior in estrous ewes. *Hormones and Behavior* 23:305-316.
- Pollard JC (1992). Effects of litter size on the vocal behaviour of ewes. *Applied Animal Behaviour Science* 34:75-84.
- Pollard JC, Shaw KJ, Littlejohn RP (1999). A note on sheltering behaviour by ewes before and after lambing. *Applied Animal Behaviour Science* 61:313-318.
- Porter RH, Levy F, Poindron P, Litterio M, Schaal B, Beyer C (1991). Individual olfactory signatures as major determinants of early maternal discrimination in sheep. *Developmental Psychobiology* 24:151-158.
- Rattray PV (1992). Nutrition of the ewe during gestation and lactation. In: AW Speedy (ed), *Progress in Sheep and Goat Research*. CAB International, Wallingford, pp. 85-106.
- Romeyer A, Poindron P, Orgeur P (1994). Olfaction mediates the establishment of selective bonding in goats. *Physiology & Behavior* 56:693-700.
- Saratsis Ph, 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.

- Scott MJ, Jones JE (1998). The carriage of *Pasteurella haemolytica* in sheep and its transfer between ewes and lambs in relation to mastitis. *Journal of comparative Pathology* 118:359-363.
- Searby A, Jouventin P (2003). Mother-lamb acoustic recognition in sheep: a frequency coding. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 270:765-771.
- Selman IE, McEwan AD, Fisher EW (1970). Studies on natural suckling in cattle during the first eight hours post partum. I. Behavioural studies (dams). *Animal Behaviour* 18:276-283.
- Sharafeldin MA, Kandeel AA (1971). Post-lambing maternal behaviour. *Journal of agricultural Science, Cambridge* 77:33-36.
- Shillito EE (1972). Vocalisation in sheep. *Journal of Physiology* 226:45-46.
- Shillito-Walser EE (1978). A comparison of the role of vision and hearing in ewes finding their own lamb. *Applied Animal Ethology* 4:71-79.
- Shillito-Walser EE, Hague P, Walters E (1981). Vocal recognition of recorded lamb voices by ewes of three breeds of sheep. *Behaviour* 78:260-272.
- Shillito-Walser EE, Walters E, Ellison J (1984). Observations on vocalization of ewes and lambs in the field. *Behaviour* 91:190-203.
- Skoufos I, Voidarou C, Bezirtzoglou E, Tzora A (2006). Effects of machine-milking on the bacterial flora of teat duct and mammary gland of ewes. *Journal of Veterinary Medicine B* 53: 499-501.
- Slee J, Springbett A (1986). Early post-natal behaviour in lambs of ten breeds. *Applied Animal Behaviour Science* 15:229-240.
- Smith FV (1965). Instinct and learning in the attachment of lamb ewe. *Animal Behaviour* 13:84-86.
- Smith FV, Van-Toller C, Boyes T (1966). The "critical period" in the attachment of lambs and ewes. *Animal Behaviour* 14:120-125.
- Sojetado RM (1952). The growth and habits of lambs. *Philippine Agriculture* 35:572-578.
- Terrazas A, Ferreira G, Levy F, Nowak R, Serafin N, Orgeur P, Soto R, Poindron P (1999). Do ewes recognize their lambs within the first day postpartum without the help of olfactory cues? *Behavioural Processes* 47:19-29.
- Terrazas A, Nowak R, Serafin N, Ferreira G, Levy F, Poindron P (2002). Twenty-four-hour-old lambs rely more on maternal behavior than on the learning of individual characteristics to discriminate between their own and an alien mother. *Developmental Psychobiology* 40:408-418.

- Titchen DA (1977). Cineradiographic studies of swallowing in the suckled lamb. *Annales de Recherche veterinaire* 8:483.
- Val-Laillet D, Simon M, Nowak R (2004). A full belly and colostrum: two major determinants of filial love. *Developmental Psychobiology* 45:163-173.
- Vautor E, Abadie G, Guibert JM, Chevalier N, Pepin M (2005). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in dairy sheep. *Veterinary Microbiology* 106:235-239.
- 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.
- Vince MA (1984). Teat-seeking or pre-sucking behaviour in newly-born lambs: possible effects of maternal skin temperature. *Animal Behaviour* 32:249-254.
- Vince MA (1986). The response of the newly-born Clun Forest lamb to maternal vocalizations. *Behaviour* 96:164-170.
- Vince MA (1992). The newly born lamb's patterns of movement before, during and after the first sucking bout. *Applied Animal Behaviour Science* 33:27-33.
- Vince MA, Lynch JJ, Motterhead BE, Green GC, Elwin RL (1987). Interactions between normal ewes and newly born lambs deprived of visual, olfactory tactile sensory information. *Applied Animal Behaviour Science* 19:119-136.
- Vince MA, Ward TM, Reader M (1984). Tactile stimulation and teat-seeking behaviour in newly born lambs. *Animal Behaviour* 32:1179-1184.
- Walker KP (2000). Mammary gland immunology around parturition. Influence of stress, nutrition and genetics. *Advances in experimental Medicine and Biology* 480:231-245.
- Weary DM, Fraser D (1995). Calling by domestic piglets: reliable signals of need? *Animal Behaviour* 50:1047-1055
- Williams DM, Mein GA (1987). Closing forces of the bovine teat canal. *Journal of Dairy Research* 54:321-325.
- Winter AC (2000). Sheep welfare: standards and practice. In: WB Martin, ID Aitken (eds) *Diseases of Sheep*, 3rd edn. Blackwell, Oxford, 9-14