

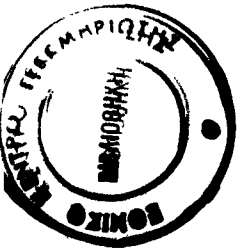
ND = 13799

ΚΣΕ = 13668

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΘΗΛΗΣ ΚΑΙ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΠΑΘΗΣΕΩΝ ΤΗΣ ΣΤΗΝ ΕΚΔΗΛΩΣΗ ΜΑΣΤΙΤΙΔΑΣ ΑΠΟ *ΜΑΝΝΗΙΜΙΑ ΗΑΕΜΟΛΥΤΙΚΑ* ΣΕ ΠΡΟΒΑΤΑ

ΒΑΣΙΛΙΚΗ Σ. ΜΑΥΡΟΓΙΑΝΝΗ

Κτηνίατρος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

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

Καρδίτσα 2006

*The method of science is the method of bold conjectures
and of ingenious and severe attempts to refute them*

Karl Popper

c 1

*Pure milk from healthy animals ought to be
common food for everybody*

Mohandas Gandhi

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διατριβή εστιάζεται στη σημασία της θηλής των προβάτων ως προστατευτικού σχηματισμού για το μαστικό αδέντα τους και αποσκοπεί: (α) στην εξέταση της δυναμικής των βακτηρίων στη θηλή των προβάτων, (β) στη μελέτη του πιθανού προστατευτικού ρόλου της θηλής των προβάτων και (γ) στην αξιολόγηση της σημασίας των παθήσεων των θηλών, ως παραγόντων που προδιαθέτουν τις προβατίνες σε μαστίτιδα.

Η διατριβή χωρίζεται σε πέντε κεφάλαια και ακολουθεί η Γενική Συζήτηση.

Στο Κεφάλαιο I ανασκοπείται η σχετική βιβλιογραφία. Το Κεφάλαιο υποδιαιρείται σε τέσσερα τμήματα. Στο τμήμα Α ανασκοπείται η βιβλιογραφία που αφορά στη μακροσκοπική ανατομική και στην ιστολογία της θηλής των προβάτων. Στο τμήμα Β περιγράφεται η μαστίτιδα των προβάτων. Στο τμήμα Γ αναφέρονται οι αμυντικοί μηχανισμοί στο μαστικό αδέντα και στο τμήμα Δ ανασκοπείται η σχετική με το βακτήριο *Mannheimia haemolytica* βιβλιογραφία.

Στο Κεφάλαιο II, μετά από σύντομη εισαγωγή (τμήμα Α), περιγράφεται και αξιολογείται μία νέα τεχνική για τη λήψη υλικού από το θηλαίο πόρο των προβάτων (τμήμα Β). Στη συνέχεια παρουσιάζονται βακτηριολογικά ευρήματα στο θηλαίο πόρο και το μαστικό έκκριμα κλινικά υγιών προβάτων, καθώς και οι επιπτώσεις της διαδικασίας άρμεξης στα ευρήματα αυτά (τμήμα Γ). Τέλος, παρουσιάζονται ιστοπαθολογικά ευρήματα σε κλινικά υγιείς θηλές προβάτων (τμήμα Δ).

Στο Τμήμα Β περιγράφεται μία νέα τεχνική, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη δειγματοληψία υλικού από το θηλαίο πόρο προβάτων και, συνακόλουθα, για τη μελέτη της βακτηριακής χλωρίδας. Επίσης, παρουσιάζεται τεκμηρίωση σχετικά με την ακρίβεια, την ασφάλεια και την επαναληψιμότητά της. Η τεχνική συνίσταται στη χρησιμοποίηση στείρου, λεπτού, πλαστικού καθετήρα 20 G, ο οποίος εισάγεται στο θηλαίο πόρο της υπό εξέταση προβατίνας. Πριν την εισαγωγή του καθετήρα, αφαιρείται ο μεταλλικός οδηγός - βελόνα και, στη συνέχεια, ο πλαστικός καθετήρας κόβεται με στείρα λεπίδα χειρουργικού νυστεριού σε μήκος 2 mm. Για τον ακριβή προσδιορισμό του σημείου τομής χρησιμοποιείται πάντοτε αποστειρωμένος μεταλλικός χάρακας, που τοποθετείται ακριβώς δίπλα στον καθετήρα. Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται επάνω σε αποστειρωμένη χειρουργική οθόνη, ο δε χειριστής φορά χειρουργικά γάντια. Στη συνέχεια γίνεται η δειγματοληψία, αφού πραγματοποιηθεί απολύμανση του στομίου και του κατώτερου τμήματος της θηλής. Ο καθετήρας συγκρατείται από το ανώτερο ευρύ πλαστικό στόμιό του και εισάγεται στο θηλαίο πόρο, στο εσωτερικό τοίχωμα του οποίου

περιστρέφεται και στη συνέχεια αφαιρείται. Το υλικό από το θηλαίο πόρο στην άκρη του καθετήρα καλλιεργείται στα ανάλογα βακτηριολογικά υποστρώματα. Η ευαισθησία της τεχνικής συγκρίθηκε με τα αποτελέσματα ξεσμάτων βλεννογόνου που είχαν ληφθεί με νυστέρι ύστερα από τη διάνοιξη της θηλής, και ήταν 99% προκειμένου για δείγματα με άγνωστη βακτηριολογική κατάσταση (δείγματα από σφαγεία) και 100% προκειμένου για δείγματα με γνωστή βακτηριολογική κατάσταση (δείγματα από πειραματόζωα). Η ειδικότητα της τεχνικής ήταν 91% και 100%, αντίστοιχα. Η ασφάλεια της τεχνικής εκτιμήθηκε σε μία μελέτη, κατά την οποία έγιναν οκτώ συνεχείς χρήσεις της τεχνικής σε προβατίνες καθόλη τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου τους. Σε κανένα ζώο δεν εκδηλώθηκε κλινική ή υποκλινική μαστίτιδα. Τέλος, η επαναληψιμότητα της μεθόδου εκτιμήθηκε με βάση τα αποτελέσματα από 37 ζεύγη δειγμάτων, που συλλέχθηκαν σε διάστημα 30 έως 40 min. μεταξύ τους. Υπήρχε 100% συμφωνία στα βακτηριολογικά αποτελέσματα των δύο δειγματοληψιών κάθε ζεύγους.

Στο Τμήμα Γ παρουσιάζονται τα βακτηριολογικά ευρήματα στο θηλαίο πόρο κλινικά υγιών προβάτων ($n=21$) σε τρεις εκτροφές. Κατά τη διάρκεια μίας ολόκληρης γαλακτικής περιόδου λαμβάνονταν τακτικά δείγματα υλικού από το θηλαίο πόρο και μαστικού εκκρίματος από τα ζώα. Κατά την περίοδο άρμεξης λαμβάνονταν ζεύγη δειγμάτων πριν και μετά τη διαδικασία άρμεξης. Συνολικά, συλλέχθηκαν 244 δείγματα κατά την περίοδο θηλασμού και 156 ζεύγη δειγμάτων κατά την περίοδο άρμεξης. Κατά την περίοδο θηλασμού, απομονώθηκαν βακτήρια από 52 (21%) δείγματα υλικού από το θηλαίο πόρο και 19 (8%) δείγματα μαστικού εκκρίματος. Τα αντίστοιχα αποτελέσματα κατά την περίοδο άρμεξης ήταν 20 (13%) και 9 (6%) για τα δείγματα πριν τη διαδικασία άρμεξης και 35 (22%) και 11 (7%) για τα δείγματα μετά τη διαδικασία άρμεξης. Υπήρχε σημαντική διαφορά στην πιθανότητα απομόνωσης βακτηρίων από το υλικό του θηλαίου πόρου απ' ό,τι από το μαστικό έκκριμα ($P<0,001$). Υπήρχε επίσης σημαντική διαφορά μεταξύ των εκτροφών στην πιθανότητα απομόνωσης βακτηρίων από το υλικό του θηλαίου πόρου ($P<0,01$) και το μαστικό έκκριμα ($P<0,001$) κατά την περίοδο του θηλασμού, αλλά όχι κατά την περίοδο της άρμεξης ($P>0,4$ και $P>0,1$, αντίστοιχα). Δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στην πιθανότητα απομόνωσης βακτηρίων κατά την περίοδο του θηλασμού ή της άρμεξης ($P>0,1$). Όσον αφορά στα ζεύγη δειγμάτων υλικού από το θηλαίο πόρο, σε 27 (17%) περιπτώσεις τα αποτελέσματα της βακτηριολογικής εξέτασης καθενός από τα δύο δείγματα του ζεύγους (που συλλέχθηκαν πριν και μετά τη διαδικασία άρμεξης), ήταν διαφορετικά: σε 6 περιπτώσεις απομονώθηκαν βακτήρια μόνον πριν την άρμεξη και σε 21 περιπτώσεις απομονώθηκαν βακτήρια μόνο μετά την άρμεξη. Τα αντίστοιχα αποτελέσματα από τα δείγματα μαστικού εκκρίματος ήταν 10 (6%): 4 και 6 περιπτώσεις. Η πλειονότητα των βακτηρίων που απομονώθηκαν ήταν πηκτάση-αρνητικοί Σταφυλόκοκκοι. Άλλοι μικροοργανισμοί

που απομονώθηκαν συχνά ήταν *Bacillus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Arcanobacterium pyogenes* και *M. haemolytica*. Επαναλαμβανόμενη απομόνωση (σε συνεχόμενες δειγματοληψίες) του ίδιου βακτηριακού είδους, από υλικό από το θηλαίο πόρο ενός συγκεκριμένου ζώου παρατηρήθηκε με *S. aureus*, *S. auricularis* και *S. chromogenes* (από 3 συνεχόμενες φορές κάθε στέλεχος), με *S. simulans* και *S. caprae* (από 2 συνεχόμενες φορές κάθε στέλεχος) από προβατίνες της εκτροφής Α, καθώς και με *M. haemolytica* (στέλεχος VSM08L, 2 συνεχόμενες φορές από προβατίνα της εκτροφής Α - στέλεχος VSM536L, 2 συνεχόμενες φορές από προβατίνα της εκτροφής Β).

Στο Τμήμα Δ παρουσιάζονται τα ιστοπαθολογικά ευρήματα σε 87 κλινικά υγιείς θηλές προβάτων. Οι θηλές προέρχονταν από μαστικούς αδένες στη γαλακτική περίοδο χωρίς απομόνωση βακτηρίων από αυτές (n=23), από μαστικούς αδένες στην ξηρά περίοδο χωρίς απομόνωση βακτηρίων από αυτές (n=25), από μαστικούς αδένες στη γαλακτική περίοδο με απομόνωση βακτηρίων από αυτές (n=22) και από μαστικούς αδένες στην ξηρά περίοδο με απομόνωση βακτηρίων από αυτές (n=17). Το κύριο ιστολογικό εύρημα ήταν υποβλεννογόνια λευκοκυτταρική διήθηση, η οποία συσχετίστηκε ($P<0.001$) με την απομόνωση βακτηρίων. Η πλειονότητα των κυττάρων στο θηλαίο κόλπο ήταν λεμφοκύτταρα, ενώ στο θηλαίο πόρο παρατηρήθηκαν ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα και λεμφοκύτταρα σε ίδια αναλογία. Σε 43 (49%) θηλές παρατηρήθηκαν συναθροίσεις λεμφοκυττάρων με εικόνα χαρακτηριστική λεμφοζιδίου, στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου. Η ύπαρξη συναθροίσεων λεμφοκυττάρων συσχετίστηκε ($P=0.032$) με την απομόνωση βακτηρίων.

Στο Κεφάλαιο III, ύστερα από σύντομη εισαγωγή (τμήμα Α), παρουσιάζονται οι συνέπειες του ενοφθαλμισμού *M. haemolytica* σε κλινικά υγιείς θηλές προβάτων (τμήμα Β).

Στον πειραματισμό χρησιμοποιήθηκαν 32 προβατίνες, οι οποίες χωρίστηκαν σε δύο ομάδες (Α ή Β, n=16) και ενοφθαλμίστηκαν με ένα από δύο διαφορετικά στελέχη του μικροοργανισμού. Το ένα στέλεχος (ES26L) είχε αποδεδειγμένη παθογόνο δράση για το μαστικό αδένες των προβάτων, ενώ το δεύτερο (VSM08L) απομονώθηκε από τη θηλή μιας υγιούς προβατίνας κατά τη διάρκεια της μελέτης που περιγράφεται στο Κεφάλαιο II, Τμήμα Β. Κάθε ομάδα χωρίστηκε σε τέσσερις ίσες υποομάδες (n=4): οι προβατίνες στις υποομάδες Α1/Β1 ενοφθαλμίστηκαν στο μαστικό παρέγχυμα, οι θηλές των προβάτων των υποομάδων Α2/Β2 εμβαπτίστηκαν σε ζωμό καλλιέργειας βακτηρίων, στις προβατίνες των υποομάδων Α3/Β3 το ενοφθαλμισμό τοποθετήθηκε σε βάθος 2 mm στη θηλή τους και, τέλος, στις προβατίνες των υποομάδων Α4/Β4 το ενοφθαλμισμό τοποθετήθηκε σε βάθος 6 mm στη θηλή τους. Στα ζώα πραγματοποιούνταν κλινική εξέταση, καθώς επίσης βακτηριολογική και κυτταρολογική εξέταση μαστικού εκκρίματος πριν και μετά τον ενοφθαλμισμό. Ένα ζώο από κάθε υποομάδα

θανατώθηκε 2, 4, 7 και 11 ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό. Όλα τα ζώα των υποομάδων A1/B1, καθώς και ένα ζώο σε καθεμιά από τις υποομάδες A4/B4 εκδήλωσαν κλινική μαστίτιδα. Τα υπόλοιπα ζώα των υποομάδων A4/B4, όλα τα ζώα των υποομάδων A3/B3 και τρία ζώα των υποομάδων A2/B2 εκδήλωσαν υποκλινική μαστίτιδα. Κανένα από τα δύο στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν, δε συσχετίστηκε με περισσότερα θετικά βακτηριολογικά ευρήματα ή με θετικά αποτελέσματα της δοκιμής CMT. Στα ζώα των υποομάδων A2/B2 βρέθηκαν λιγότερα θετικά βακτηριολογικά ή κυτταρολογικά αποτελέσματα από τα ζώα των υποομάδων A3/B3 και A4/B4. Στα ζώα των υποομάδων A2/B2 παρατηρήθηκε ήπια λευκοκυτταρική διήθηση των θηλών τους. Στα ζώα των υποομάδων A3/B3, εκτός από τη λευκοκυτταρική διήθηση (ουδετερόφιλα, λεμφοκύτταρα και πλασμοκύτταρα), παρατηρήθηκε συνάθροιση λεμφοκυττάρων με εικόνα χαρακτηριστική λεμφοζιδίου, με ή χωρίς ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα και βλαστική δραστηριότητα στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου. Τέλος, στα ζώα των υποομάδων A4/B4, το κύριο εύρημα ήταν η έντονη υποβλεννογόνια λευκοκυτταρική διήθηση στη θηλή. Δεν υπήρχε διαφορά στην ένταση των παθολογοανατομικών ευρημάτων μεταξύ των δύο στελεχών. Αν και το στέλεχος VSM08L είχε απομονωθεί από τη θηλή υγιούς προβατίνας, προκάλεσε κλινική μαστίτιδα, όταν ενοφθαλμίστηκε στο μαστικό παρέγχυμα. Αν και το στέλεχος ES26L είναι αποδεδειγμένης παθογόνου δράσης για το μαστικό αδένα, δεν προκάλεσε κλινική μαστίτιδα, όταν τοποθετήθηκε μέσα στη θηλή σε βάθος 2 mm.

Στο Κεφάλαιο IV, μετά από σύντομη εισαγωγή (τμήμα A), παρουσιάζονται κλινικά περιστατικά παθήσεων των θηλών σε προβατίνες (τμήμα B).

Συγκεκριμένα, παρουσιάζονται τα κλινικά, βακτηριολογικά και κυτταρολογικά ευρήματα σε ένα περιστατικό υπερμεγέθων θηλών, δύο περιστατικά πιθανής θηλωμάτωσης, ένα περιστατικό σταφυλοκοκκικής δερματίτιδας στο δέρμα του μαστού και των θηλών, ένα περιστατικό υποδόριων οζιδίων στις θηλές, ένα περιστατικό υποδόριου αποστήματος στη θηλή, δύο περιστατικά τραυματισμών στο σώμα της θηλής, ένα περιστατικό πιθανής χρόνιας φλεγμονής των θηλών με συνακόλουθη στένωση και ένα περιστατικό λοιμώδους εκθύματος. Σε κάποια από τα ζώα έγινε ευθανασία, και στη συνέχεια παθολογοανατομική εξέταση, οπότε περιγράφονται και τα μακροσκοπικά νεκροτομικά και ιστοπαθολογικά ευρήματα.

Στο Κεφάλαιο V, ύστερα από σύντομη εισαγωγή (τμήμα A), παρουσιάζονται οι συνέπειες του ενοφθαλμισμού *M. haemolytica* σε θηλές προβάτων με αλλοιώσεις (τμήμα B).

Χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *M. haemolytica* VSM08L, το οποίο δεν είχε προκαλέσει κλινική μαστίτιδα, όταν σε προηγούμενο πειραματισμό είχε τοποθετηθεί σε υγιείς θηλές (Κεφάλαιο III, Τμήμα B) και πραγματοποιήθηκαν δύο πειραματισμοί. Στον πρώτο, το βακτήριο τοποθετήθηκε στο θηλαίο πόρο προβάτων με αλλοιώσεις στις θηλές από λοιμώδες έκθυμα (ομάδα A, n=5) ή

από θηλώματα (ομάδα Β, n=3). Στο δεύτερο πειραματισμό, το βακτήριο τοποθετήθηκε στο θηλαίο πόρο (ομάδα Γ, n=7) ή στο δέρμα της θηλής (ομάδα Δ, n=4) προβάτων με τεχνητά προκληθείσες αλλοιώσεις στις θηλές τους. Επιπλέον, στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν και προβατίνες με κλινικά υγιείς θηλές, ως μάρτυρες, το δε βακτήριο τοποθετήθηκε στο θηλαίο πόρο (ομάδα Ε, n=5) ή στο δέρμα των θηλών τους (ομάδα ΣΤ, n=2). Στα ζώα πραγματοποιούνταν κλινική εξέταση, καθώς επίσης βακτηριολογική και κυτταρολογική εξέταση μαστικού εκκρίματος πριν και μετά τον ενοφθαλμισμό. Τα ζώα κάθε ομάδας θανατώνονταν 2 ώρες έως 4 ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό. Οι προβατίνες των ομάδων Α, Β, Γ εκδήλωσαν κλινική μαστίτιδα σε 5 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό, ενώ αυτές της ομάδας Δ σε 2 ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό τους. Κανένα από τα ζώα-μάρτυρες δεν εκδήλωσε κλινική μαστίτιδα. Στις προβατίνες με αλλοιώσεις στις θηλές, το βακτήριο απομονώθηκε από το μαστικό έκκριμα και η δοκιμή CMT ήταν θετική ήδη 5 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό τους. Κατά την κυτταρολογική εξέταση μαστικού εκκρίματος, στα μεν ζώα των ομάδων Α και Β παρατηρήθηκαν ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα και λεμφοκύτταρα, όχι όμως μακροφάγα, στα δε ζώα των ομάδων Γ και Δ παρατηρήθηκαν μακροφάγα, ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα και λεμφοκύτταρα. Στα ζώα των ομάδων Ε και ΣΤ παρατηρήθηκαν κυρίως ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα. Κατά την νεκροτομική εξέταση των ενοφθαλμισμένων θηλών των ζώων των ομάδων Α, Β, Γ και Δ, παρατηρήθηκαν πτυχώσεις, υπεραιμία και πάχυνση του βλεννογόνου των θηλών, ενώ κατά την ιστοπαθολογική εξέταση το κύριο εύρημα ήταν λευκοκυτταρική (ουδετερόφιλα, λεμφοκύτταρα, πλασμοκύτταρα) διήθηση. Επιπλέον, στα ζώα των ομάδων Γ και Δ παρατηρήθηκαν εξελκώσεις και διάβρωση του δέρματος της θηλής, καθώς και συνάθροιση λεμφοκυττάρων με εικόνα χαρακτηριστική λεμφοζιδίου στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου. Στο μαστικό παρέγχυμα παρατηρήθηκαν μακροσκοπικές και ιστολογικές αλλοιώσεις, χαρακτηριστικές αιμορραγικής μαστίτιδας. Στα ζώα-μάρτυρες παρατηρήθηκε λευκοκυτταρική διήθηση στο επιθήλιο του θηλαίου πόρου, ενώ στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου παρατηρήθηκε συνάθροιση λεμφοκυττάρων με εικόνα χαρακτηριστική λεμφοζιδίου. Σε αντίθεση με τις υγιείς προβατίνες, τα ζώα με αλλοιώσεις στις θηλές εκδήλωσαν έντονη κλινική μαστίτιδα, πολύ σύντομα μετά τον ενοφθαλμισμό τους.

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

(α) Η χρήση στείρου, λεπτού, πλαστικού καθετήρα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη λήψη υλικού από το θηλαίο πόρο προβάτων. Η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μελέτες της οικολογίας των βακτηρίων στη θηλή. Η χρήση της μεθόδου σε ζεύγη δειγμάτων από το θηλαίο πόρο μπορεί να παράσχει πληροφορίες σχετικές με τη δυναμική της μόλυνσης.

(β) Η υγιής θηλή παρέχει αποτελεσματική προστασία στο μαστικό αδέννα κατά των εισβαλλόντων μικροοργανισμών. Στο θηλαίο πόρο βρίσκονται συχνά βακτήρια, τα οποία όμως δεν εισβάλλουν στο μαστικό παρέγχυμα. Η θηλή παρέχει αποτελεσματική προστασία από παθογόνα στελέχη *M. haemolytica*, μετά από ενοφθαλμισμό στο θηλαίο πόρο.

(γ) Η διαδικασία άρμεξης προδιαθέτει στην είσοδο βακτηρίων στη θηλή. Όμως, η είσοδος στη θηλή δεν καταλήγει σε αυξημένη εισβολή στο μαστικό παρέγχυμα.

(δ) Ο λεμφικός ιστός στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου φαίνεται ότι αποτελεί σχηματισμό με σημαντική αμυντική δραστηριότητα. Ο λεμφικός ιστός βρίσκεται και σε κλινικά υγιείς θηλές με βακτηριακή χλωρίδα. Σε περιπτώσεις πρόσφατης μόλυνσης, ο λεμφικός ιστός παρουσιάζει βλαστική δραστηριότητα. Οι τοπικοί αμυντικοί μηχανισμοί στη θηλή φαίνεται ότι είναι ιδιαίτερης σημασίας στην άμυνά της.

(ε) Οι παθήσεις των θηλών προδιαθέτουν τις προβατίνες σε μαστίτιδα. Διάφοροι μηχανισμοί εμπλέκονται στην προδιάθεση των ζώων σε μαστίτιδα. Σε περιπτώσεις παθήσεων των θηλών οι αμυντικοί μηχανισμοί της θηλής δεν μπορούν να αντιμετωπίσουν αποτελεσματικά τους εισβάλλοντες μικροοργανισμούς, με αποτέλεσμα την εκδήλωση μαστίτιδας. Η διαδικασία πρόκλησης αλλοιώσεων τύπου "charring" στις θηλές αποτελεί χρήσιμο πρότυπο για τη μελέτη των παθήσεών τους.

Δημοσιεύσεις σχετιζόμενες με την παρούσα διατριβή

Στις παρακάτω επιστημονικές δημοσιεύσεις παρουσιάζονται τμήματα της παρούσας διατριβής:

I. Β.Σ. Μαυρογιάννη, Γ.Χ. Φθενάκης (2004). "Αμυντικοί μηχανισμοί στο μαστικό αδέννα των αγελάδων" *Περιοδικό της ελληνικής κτηνιατρικής Εταιρείας*, 55:235-246.

II. V.S. Mavrogianni, G.C. Fthenakis, H. Brooks, N. Papaioannou, P.J. Cripps, I. Taitzoglou, G. Brellou, P. Saratsis (2005). "The effects of inoculation of *Mannheimia haemolytica* into the teat of lactating ewes" *Veterinary Research*, 36:13-25.

III. V.S. Mavrogianni, P.J. Cripps, N. Papaioannou, I. Taitzoglou, G.C. Fthenakis (2006). "Teat disorders predispose ewes to clinical mastitis after challenge with *Mannheimia haemolytica*" *Veterinary Research*, 37:89-105.

IV. V.S. Mavrogianni, P.J. Cripps, G.C. Fthenakis (2006). "Description and validation of a novel technique to study the bacterial flora of the teat duct of ewes" *Small Ruminant Research*, υπό εκτύπωση.

V. V.S. Mavrogianni, P.J. Cripps, H. Brooks, I.A. Taitzoglou, G.C. Fthenakis (2006). "Presence of sub-epithelial lymphoid nodules in the teat of ewes" *Anatomia Histologia Embryologia*, δεκτό για δημοσίευση.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Γ.Χ. Φθενάκης, Αναπληρωτής καθηγητής	Επιβλέπων
Κλινική Μαιευτικής και Αναπαραγωγής, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας	
Φ. Σαράτσης, Καθηγητής	Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής
Κλινική Παραγωγικών Ζώων, Κτηνιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης	
Ι.Α. Ταϊτζόγλου, Αναπληρωτής καθηγητής	Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής
Εργαστήριο Φυσιολογίας, Κτηνιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης	

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ν. Κοκόλης, Καθηγητής	Κτηνιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
Κ. Μπόσκος, Καθηγητής	Κτηνιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
Φ. Σαράτσης, Καθηγητής	Κτηνιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
Κ. Αλεξόπουλος, 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

**PROTECTIVE ROLE OF THE TEAT
AND IMPORTANCE OF ITS DISORDERS
IN OVINE MASTITIS ASSOCIATED WITH
*MANNHEIMIA HAEMOLYTICA***

VASILIKI S. MAVROGIANNI

DVM (Thessaly)

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

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

Karditsa, Greece 2006

ABSTRACT

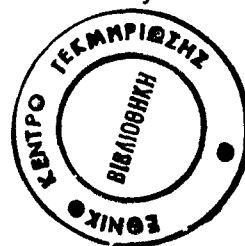
The objectives of the present thesis were: (i) the study of the dynamics of infection of bacteria in the teat of ewes, (ii) the elucidation of the role of the teat as a protective structure for the mammary gland of ewes and (iii) the evaluation of the importance of the disorders of the teats in predisposing ewes to mastitis.

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

In the first Chapter, the relevant literature is reviewed. The Chapter is subdivided into four Parts. In Part A the literature on the anatomy and histology of the teat of ewes is briefly reviewed. In Part B the literature on ovine mastitis is presented. In Part C the literature on the defence mechanisms of the mammary gland is cited and in Part D the literature on *M. haemolytica* is reviewed.

In the second Chapter, after a brief introduction (Part A), a novel technique to obtain material from the teat duct of ewes is described and validated (Part B). Then, the bacteriological findings in the teat duct and the mammary gland of clinically healthy ewes, as well the effects of milking are presented (Part C). Finally, the histopathological findings in clinically healthy teats of ewes are presented (Part D).

In Part B, a new technique that may be used for studying the bacterial flora of the teat duct in live ewes is described; furthermore, evidence regarding its accuracy, safety and repeatability is presented. A sterile, plastic, 20 G catheter is used for sampling. The catheter stylet is taken out and the plastic catheter cut with a sterile blade to a length of 2 mm. In order to ensure accurate and consistent cutting of the catheter at the desired length, a sterilized ruler is placed beside the catheter. The whole procedure is carried out under aseptic conditions, on sterilized surgical screens. Before sampling, a thorough disinfection with povidone iodine scrub solution of the teat apex and the lower (1 cm) part of the teat skin, is carried out. The investigator holds the catheter from the cannula hub; then, it is inserted into the teat, rolled around the internal teat wall, in order to sample the mucosa, and then withdrawn. Material collected on the tip of the catheter is plated onto bacteriological media. The sensitivity of the technique compared to a method that detects the bacterial flora of the teat after slaughter of the animals (scratching of the teat mucosa by means of a scalpel blade) was 99% for field samples and 100% for experimental samples; specificity of the technique was 91% and 100%, respectively; kappa-coefficient between results of the two methods was 0.9045. The safety of the technique was



assessed in an investigation, where ewes were repeatedly (eight times) sampled by means of this technique, throughout their lactation; in no case was clinical or subclinical mastitis recorded. Finally, the repeatability of the method was assessed in 37-paired samples, obtained 30 to 40 min. apart; a 100% match was recorded between bacteriological results of the two samplings of each pair.

In Part C, bacteriological findings in the teat duct and the mammary gland of clinically healthy ewes, as well the effects of milking are presented. Teat duct catheter samples (obtained by the method described above) and mammary secretion samples were regularly collected throughout lactation (suckling and milking period) of 21 clinically healthy ewes in three farms. Paired-samples were also obtained before and after the milking procedure. In total, 244 samples were collected during the suckling period and 156 paired-samples during the milking period. During the suckling period, bacteria were isolated from 52 (21%) catheter samples and 19 (8%) secretion samples. Respective results for the milking period were 20 (13%) and 9 (6%) for samples collected before the milking procedure and 35 (22%) and 11 (7%) collected after that. There was an increased risk of teat duct catheter samples rather than secretion samples becoming infected ($P < 0.001$). There was also an increased effect of the sheep farm for catheter ($P < 0.01$) and secretion ($P < 0.001$) samples becoming infected during the suckling period, but not during the milking period ($P > 0.4$ και $P > 0.1$, respectively). There was not strong evidence for an increased risk during the suckling or the milking period ($P > 0.1$). In 27 (17%) cases, bacteriological findings in the two catheter samples of each pair (collected before and after the milking procedure) were different; in 6 cases bacteria were isolated only before milking, whilst in 21 cases bacteria were isolated only after milking. Respective results for secretion samples were 10 (6%): 4 and 6 cases. The majority of bacteria isolated were coagulase-negative Staphylococci. Other bacteria frequently isolated were *Bacillus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Arcanobacterium pyogenes* and *M. haemolytica*. Persistent isolation of the same bacterial species from catheter samples obtained from a particular ewe, was recorded with a *S. aureus*, a *S. auricularis* and a *S. chromogenes* isolate (each isolate for 3 consecutive times), a *S. simulans* and a *S. caprae* isolate (each isolate for 2 consecutive times), as well as with two *M. haemolytica* isolates (VSM08L, 2 consecutive times from a farm A ewe; VSM536L, 2 consecutive times from a farm B ewe).

In Part D, a total of 87 clinically healthy ovine teats were examined bacteriologically (by scraping the mucosa) and histologically. Origin of teats was: from lactating mammary glands with no bacteria isolated (n=23), from mammary glands after cessation of lactation with no bacteria isolated (n=25); from lactating mammary glands with bacteria isolated (n=22); from

mammary glands after cessation of lactation with bacteria isolated (n=17). The salient histological feature was subepithelial leucocytic infiltration, which was associated ($P<0.001$) with isolation of bacteria. In teat cisterns, lymphocytes were the predominant cell type and in teat ducts, lymphocytes and neutrophils were seen in equal proportions. Lymphoid nodules were detected in 43 (49%) teats. In the majority of cases, they were observed at the border between teat duct and teat cistern; their presence was associated with isolation of bacteria ($P=0.032$).

In the third Chapter, after a brief introduction (Part A), the features of experimental inoculation of *M. haemolytica* into clinically healthy teats of ewes are presented (Part B).

Thirty-two (32) ewes were used in the study and allocated into one of two groups (A or B, n=16); they were challenged with one of two isolates of *M. haemolytica*, respectively, strain ES26L of known pathogenicity or strain VSM08L from the teat duct of a healthy ewe. Each group was further divided into four equal subgroups (n=4): ewes in subgroups A1/B1 were challenged intramammarily; one teat of ewes in subgroups A2/B2 was immersed into a broth-culture of the organism; one teat of ewes in subgroups A3/B3 was inoculated 2 mm-deep, whilst one teat of ewes in subgroups A4/B4 was inoculated 6 mm-deep. Animals were monitored clinically, bacteriologically and cytologically before and after challenge; one animal in each subgroup was euthanatised 2, 4, 7 and 11 days after challenge. All ewes in subgroups A1/B1 and one ewe in each of subgroups A4/B4 developed clinical mastitis. All other ewes in subgroups A4/B4, all ewes in subgroups A3/B3 and three ewes in subgroups A2/B2 developed subclinical mastitis. Neither of the two strains used was associated with more positive bacteriological or CMT results; subgroups A2/B2 were associated with less positive results than subgroups A3/B3 and A4/B4. In some ewes of subgroups A2/B2, mild leucocytic infiltration in the teat was evident; in ewes of subgroups A3/B3, leucocytic infiltration (neutrophils, lymphocytes, plasma cells) was seen, as well as lymphoid nodules with germinal activity at the border between teat duct and teat cistern; in ewes of subgroups A4/B4, intense subepithelial leucocytic infiltration was the salient feature. No differences in the severity of lesions between the two strains used or the three treatments carried out were found. Although strain VSM08L had been isolated from the teat duct of a healthy ewe, it caused mastitis when inoculated intramammarily; although strain ES26L is of known pathogenicity for the mammary gland, it did not cause clinical mastitis when deposited 2 mm-deep into the teat.

In the fourth Chapter, after a brief introduction (Part A), cases of disorders of teats of ewes are described (Part B).

Ten cases of abnormalities in teats of ewes were examined in detail and the clinical, bacteriological and cytological features are presented. These included a case of large teats,

two cases of papilloma infection, a case of staphylococcal dermatitis in the skin of the udder and the teats, a case of subcutaneous nodules in a teat, a case of subcutaneous abscess in a teat, two cases of wounds in the teat, a case of long-standing inflammation of the teats with consequent stenosis and a case of contagious ecthyma. Some of the animals were euthanatised and a pathological examination was carried out. In these cases, the gross pathological and histopathological features are also described.

In the fifth Chapter, after a brief introduction (Part A), the results of two experiments carried out to study the features of experimental inoculation of *M. haemolytica* into ovine teats, are presented (Part B).

M. haemolytica strain VSM08L isolated from the teat duct of a healthy ewe (Chapter II, Part C), which had not caused clinical mastitis when deposited into healthy teats, was used. In the first experiment, this was deposited into the duct of teats with orf (A, n=5) or papilloma (B, n=3). In the second, teats were chapped and then, the organism was deposited into the duct (C, n=7) or on the skin (D, n=4). Ewes with healthy teats were controls (E, deposition into duct, n=5; F, deposition on skin, n=2). Ewes in A, B or C developed clinical mastitis 5 h later, whilst ewes in D 2 d later; no control ewes developed clinical mastitis. In ewes with teat lesions, the organism was isolated from secretion samples and the CMT became positive 5 h after challenge; neutrophils and lymphocytes were seen in secretion films from A or B ewes, whilst macrophages, neutrophils and lymphocytes in films from C or D ewes; neutrophils were predominating in films from E or F ewes. Inside the teats of A, B, C or D ewes, folds, hyperaemia and mucosal thickness were seen; histologically, subepithelial leucocytic infiltration was seen. In C or D ewes, intense erosion and ulceration of the teat skin and conspicuous lymphoid nodules at the teat duct - cistern border, were evident; lesions characteristic of haemorrhagic mastitis were in the mammary parenchyma. In control ewes, subepithelial leucocytic infiltration in the teat duct and lymphoid tissue as above, were evident.

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

- (a) Plastic, sterile, fine catheters can be used to sample the mucosa of the teat duct of ewes. The method can be used to study bacterial ecology inside the teat duct. Application of the method in paired samples from the teat duct can provide information regarding the dynamics of infection.
- (b) The healthy teat provides adequate protection to the mammary gland against invading microorganisms. Although bacteria are frequently found in the teat duct, they do not colonise

the mammary parenchyma. In experimental studies, it was found that the teat effectively protected against pathogenic *M. haemolytica* strains, inoculated into the teat duct.

(c) The milking process predisposes to bacterial entrance into the teat. However, entrance to the teat duct is not followed by invasion to the mammary parenchyma.

(d) The lymphoid tissue observed at the border between teat duct and teat cistern appears to be of significant defence activity. The lymphoid tissue has been observed in sections of clinically healthy teats with or without bacterial flora. In cases of recent infection, the lymphoid tissue showed germinal activity. Local defence mechanisms inside the teat appear to be of significant importance.

(e) Teat disorders predispose ewes to mastitis. Various mechanisms are implicated to impair the defence mechanisms of the teat. In cases of teat disorders, defence mechanisms cannot effectively the invading microorganisms, resulting in mastitis. "Chapping" type lesions in teats can be useful as a model for the study of their disorders.

Publications associated with the present thesis

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

I. V.S. Mavrogianni, G.C. Fthenakis (2005). "Defence mechanisms in the bovine mammary gland" *Journal of the hellenic veterinary medical Society*, 55:235-246.

II. V.S. Mavrogianni, G.C. Fthenakis, H. Brooks, N. Papaioannou, P.J. Cripps, I. Taitzoglou, G. Brellou, P. Saratsis (2005). "The effects of inoculation of *Mannheimia haemolytica* into the teat of lactating ewes" *Veterinary Research*, 36:13-25.

III. V.S. Mavrogianni, P.J. Cripps, N. Papaioannou, I. Taitzoglou, G.C. Fthenakis (2006). "Teat disorders predispose ewes to clinical mastitis after challenge with *Mannheimia haemolytica*" *Veterinary Research*, 37:89-105.

IV. V.S. Mavrogianni, P.J. Cripps, G.C. Fthenakis (2006). "Description and validation of a novel technique to study the bacterial flora of the teat duct of ewes" *Small Ruminant Research*, in press.

V. V.S. Mavrogianni, P.J. Cripps, H. Brooks, I.A. Taitzoglou, G.C. Fthenakis (2006). "Presence of sub-epithelial lymphoid nodules in the teat of ewes" *Anatomia Histologia Embryologia*, accepted for publication.

ADVISORY COMMITTEE

Associate professor G C Fthenakis

Supervisor

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

Professor Ph Saratsis

Member of the advisory committee

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

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 Boscas

School of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki

Professor N. Kokolis

School of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki

Professor Ph. Saratsis

School of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki

Associate professor C. Alexopoulos

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	10
ABSTRACT	12
ADVISORY COMMITTEE - EXAMINATION BOARD	17
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	18
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	21
Πρόλογος- Σκοποί της παρούσας διατριβής	22
Ευχαριστίες	25
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι	27
ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ	
Α. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΜΑΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ	
ΤΗΣ ΘΗΛΗΣ ΤΩΝ ΠΡΟΒΑΤΩΝ	28
Β. ΜΑΣΤΙΤΙΔΑ ΤΩΝ ΠΡΟΒΑΤΩΝ	34
Εισαγωγή	34
Σημασία της μαστίτιδας	34
Συχνότητα της μαστίτιδας στην Ελλάδα	36
Κλινική εκδήλωση	37
Αιτιολογικοί παράγοντες	39
Προδιαθέτοντες παράγοντες	45
Παθογένεια	50
Διάγνωση	53

Γ. ΑΜΥΝΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΟ ΜΑΣΤΙΚΟ ΑΔΕΝΑ	60
Εισαγωγή	60
Η θηλή	60
Κυτταρικοί αμυντικοί μηχανισμοί	61
Χυμικοί αμυντικοί μηχανισμοί	67
Δ. ΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ <i>MANNHEIMIA HAEMOLYTICA</i>	73
Ταξινόμηση	73
Οικολογία και παθογόνος δράση	74
Λοιμογόνοι παράγοντες	75
Παθογόνος δράση για τα πρόβατα	79
Δειγματοληψία - Ταυτοποίηση	80
ΚΕΦΑΛΑΙΟ II	81
ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΚΑ ΚΑΙ ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΣΕ ΘΗΛΕΣ ΚΛΙΝΙΚΑ ΥΓΙΩΝ ΠΡΟΒΑΤΩΝ	
Α. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	82
Β. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΙΑΣ ΝΕΑΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΓΙΑ ΛΗΨΗ ΥΛΙΚΟΥ ΑΠΟ ΤΟ ΘΗΛΑΙΟ ΠΟΡΟ ΠΡΟΒΑΤΩΝ	84
Υλικά και μέθοδοι	84
Αποτελέσματα	90
Γ. ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΣΕ ΘΗΛΕΣ ΚΛΙΝΙΚΑ ΥΓΙΩΝ ΠΡΟΒΑΤΩΝ	94
Υλικά και μέθοδοι	94
Αποτελέσματα	98
Δ. ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΣΕ ΘΗΛΕΣ ΚΛΙΝΙΚΑ ΥΓΙΩΝ ΠΡΟΒΑΤΩΝ	106
Υλικά και μέθοδοι	106
Αποτελέσματα	108

ΚΕΦΑΛΑΙΟ III	113
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΟΣ <i>MANNHHEIMIA HAEMOLYTICA</i> ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΥΓΙΕΙΣ ΘΗΛΕΣ ΠΡΟΒΑΤΩΝ	
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	114
B. ΣΥΝΕΠΕΙΕΣ ΤΟΥ ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΟΥ	115
Υλικά και μέθοδοι	115
Αποτελέσματα	121
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV	 135
ΚΛΙΝΙΚΑ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΑ ΠΑΘΗΣΕΩΝ ΘΗΛΩΝ ΣΕ ΠΡΟΒΑΤΑ	
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	136
B. ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΩΝ	138
Υλικά και μέθοδοι	138
Αποτελέσματα	140
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ V	 161
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΟΣ <i>MANNHHEIMIA HAEMOLYTICA</i> ΣΕ ΘΗΛΕΣ ΠΡΟΒΑΤΩΝ ΜΕ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ	
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	162
B. ΣΥΝΕΠΕΙΕΣ ΤΟΥ ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΟΥ	163
Υλικά και μέθοδοι	163
Αποτελέσματα	169
 ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	 190
Εισαγωγή	191
Περιγραφή και αξιολόγηση μίας νέας τεχνικής για λήψη υλικού από το θηλαίο πόρο προβάτων	191
Προστατευτικός ρόλος της θηλής	193
Επίδραση των παθήσεων της θηλής στον προστατευτικό ρόλο της	201
Σημασία του λεμφικού ιστού στη θηλή	208
Επίλογος	211
 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ	 213

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Πρόλογος - Σκοποί της παρούσας διατριβής

Η μαστίτιδα είναι η πιο σημαντική ασθένεια του μαστικού αδένου (Schalm, Carroll & Jain 1971). Τα αίτια των οικονομικών επιπτώσεων της μαστίτιδας στις προβατοτροφικές εκμεταλλεύσεις αναφέρονται παρακάτω.

- α. Θάνατος ασθενών θηλυκών ζώων.
- β. Απώλεια της λειτουργίας ενός μαστικού αδένου και ανάγκη πρόωρης απομάκρυνσης θηλυκών ζώων.
- γ. Έξοδα αντικατάστασης των ζώων που απομακρύνονται πρόωρα.
- δ. Κτηνιατρικές δαπάνες.
- ε. Μειωμένη γαλακτοπαραγωγή προβάτων.
- στ. Αυξημένη θνησιμότητα και μικρότερη από την κανονική αύξηση βάρους των αμνών ασθενών προβάτων.
- ζ. Υποβάθμιση της ποιότητας του γάλακτος.
- η. Απόρριψη γάλακτος που είναι ακατάλληλο για ανθρώπινη κατανάλωση.
- θ. Μειωμένη γονιμότητα των προσβεβλημένων ζώων.

Η πρώτη περιγραφή της ασθένειας έγινε το 1823 από το Γάλλο συγγραφέα Hurtrel d'Arboval, ο οποίος την περιέγραψε σε ένα λεξικό της γαλλικής γλώσσας, στο λήμμα "araignée" (=αράχνη), δηλαδή στην ονομασία, με την οποία αναφέρονταν στην ασθένεια οι προβατοτρόφοι της εποχής (Nocard 1887). Ο συγγραφέας ανέφερε ότι η ασθένεια ήταν οξεία, συνήθως με θανατηφόρα κατάληξη και ότι πιθανόν οφειλόταν σε δῆγμα εντόμου.

Η πρώτη επιστημονική διερεύνηση της νόσου έγινε από τον Edmund Nocard, μαθητή του Pasteur. Ο ερευνητής περιέγραψε με ακρίβεια και λεπτομέρεια τα κλινικά συμπτώματα και τα παθολογοανατομικά ευρήματα της ασθένειας, απομόνωσε από παθολογικό μαστικό έκκριμα προβατίνας ένα "μικρόκοκκο", του οποίου μελέτησε τα μορφολογικά, καλλιεργητικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά και ανέφερε ότι μετά από ενδομαστικό ενοφθαλμισμό μαστικού εκκρίματος σε υγιείς προβατίνες εκδηλωνόταν πάντα ασθένεια όμοια προς την αρχική (Nocard 1887). Ο Bridre (1907) πραγματοποίησε σε εκτροφές προβάτων στη Γαλλία την πρώτη μελέτη περιγραφικής επιδημιολογίας και επιχείρισε την ανοσοπροφύλαξη προβάτων.

Ο Leyshon (1929), κτηνίατρος της δημοτικής αρχής του Λονδίνου, περιέγραψε τα χαρακτηριστικά της νόσου στην Αγγλία, αλλά ανέφερε την απομόνωση ενός μικροοργανισμού με χαρακτηριστικά διαφορετικά από αυτά του μικρόκοκκου, που είχε απομονωθεί στη Γαλλία.

Στη συνέχεια ακολούθησαν κι άλλες μελέτες πάνω στη νόσο, όμως λίγες σχετικά δημοσιεύσεις υπήρχαν μέχρι τις αρχές του 1980. Οι περισσότερες δημοσιεύσεις προέρχονταν

από επιστημονικά ιδρύματα σε χώρες, όπου η γαλακτοπαραγωγή αποτελεί την κύρια παραγωγική κατεύθυνση των προβάτων, δηλαδή χώρες της Νότιας Ευρώπης, της Βαλκανικής χερσονήσου, της Βόρειας Αφρικής και της Μέσης Ανατολής. Η πλειονότητα αυτών των ανακοινώσεων αφορούσαν στην αιτιολογία και την επιδημιολογία της ασθένειας. Τέλος, παρουσιάστηκαν κάποιες δημοσιεύσεις που αφορούσαν σε προσπάθειες προστασίας των ζώων με ανοσοποίηση τους. Οι πρώιμες δημοσιεύσεις που αφορούν στην ασθένεια έχουν ανασκοπηθεί από το Minett (1939), τον Pegreff (1963) και τους Landau και Tamarin (1974).

Μολοταύτα, δεν είχαν γίνει εκτεταμένες ερευνητικές προσπάθειες μελέτης της ασθένειας έως την αρχή της δεκαετίας του 1980. Τότε ξεκίνησε ένα εκτενές ερευνητικό πρόγραμμα στο Βασιλικό Κτηνιατρικό Κολέγιο του Πανεπιστημίου του Λονδίνου υπό την καθοδήγηση του καθηγητή J.E.T. Jones και τη χρηματοδότηση διάφορων δημόσιων ή ιδιωτικών φορέων. Οι ερευνητικοί στόχοι εκείνης της ομάδας επικεντρώθηκαν στη μελέτη της παθογένειας της ασθένειας. Ως αποτέλεσμα, εκπονήθηκαν πέντε διδακτορικές διατριβές στο Πανεπιστήμιο του Λονδίνου (El-Masannat 1987, Fthenakis 1988, Watkins 1990, Vaz 1994, Burriel 1994). Επιπλέον, δημοσιεύτηκε πληθώρα επιστημονικών άρθρων και ανακοινώσεων σε επιστημονικές συναντήσεις.

Στην αρχή της δεκαετίας του 1990, άρχισε μία δι-ευρωπαϊκή συνεργασία ερευνητικών ομάδων αποτελούμενων από επιστήμονες από τη Γαλλία, την Ισπανία, την Ιταλία, την Ολλανδία και την Αυστρία, υπό το συντονισμό του καθηγητή X. Berthelot (Εθνική Κτηνιατρική Σχολή της Τουλούζης) και τη χρηματοδότηση της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Στο πλαίσιο εκείνης της συνεργασίας μελετήθηκαν οι επιπτώσεις της νόσου στο γάλα, στα γαλακτοκομικά προϊόντα και στη δημόσια υγεία. Επίσης, προσδιορίστηκαν σταθερότυποι για το γάλα, με σκοπό τη μελλοντική ενσωμάτωσή τους στην Ευρωπαϊκή νομοθεσία. Επιπλέον, δημοσιεύτηκαν επιστημονικά άρθρα και παρουσιάστηκαν ανακοινώσεις σε επιστημονικές συναντήσεις.

Στην ουσία, τα ευρήματα αυτών των δύο ερευνητικών προσπαθειών έχουν θέσει τα θεμέλια της σύγχρονης γνώσης στη μαστίδα των προβάτων. Στη συνέχεια έχουν πραγματοποιηθεί και νεότερες μελέτες στο αντικείμενο αυτό και η ασθένεια έχει πλέον περιγραφεί σε όλες τις προβατοτροφικές χώρες του κόσμου.

Όμως, σε προηγούμενες μελέτες παθογένειας της ασθένειας το ενδιαφέρον των ερευνητών επικεντρώθηκε στη διαδικασία της νόσου αυτής καθεαυτής, δηλαδή μετά την εναπόθεση των μικροοργανισμών απευθείας μέσα στο μαστικό παρέγχυμα. Έτσι, η αρχική φάση της ασθένειας και, συνακόλουθα, ο ρόλος της θηλής των ζώων είχαν αγνοηθεί. Η είσοδος του μικροοργανισμού στη θηλή του ζώου και η αρχική φλεγμονώδης αντίδραση καθορίζουν

στην ουσία την εξέλιξη της νόσου. Άλλωστε, η θηλή αποτελεί την πύλη εισόδου των μικροοργανισμών στο μαστικό παρέγχυμα.

Η παρούσα διατριβή εστιάζεται στη σημασία της θηλής των προβάτων ως προστατευτικού σχηματισμού για το μαστικό αδένι τους και αποσκοπεί:

- Στην εξέταση της δυναμικής των βακτηρίων στη θηλή των προβάτων,
- Στη μελέτη του πιθανού προστατευτικού ρόλου της θηλής των προβάτων,
- Στην αξιολόγηση της σημασίας των παθήσεων των θηλών, ως παραγόντων που προδιαθέτουν τις προβατίνες σε μαστίτιδα.

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στην Κλινική Μαιευτικής και Αναπαραγωγής του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η ερευνητική εργασία που περιγράφεται διήρκεσε από το φθινόπωρο του 2002 έως την άνοιξη του 2005 και η συγγραφή της διατριβής έλαβε χώρα κατά το 2005. Η προσωπική υποτροφία και τα έξοδα της διατριβής καλύφθηκαν από το ερευνητικό πρόγραμμα "Παθήσεις των θηλών των μικρών μηρυκαστικών", στο πλαίσιο του έργου "Ηράκλειτος: υποτροφίες έρευνας με προτεραιότητα στη βασική έρευνα, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας", που χρηματοδοτήθηκε από το Υπουργείο Παιδείας και την Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΠΕΑΕΚ, Μέτρο: Αναβάθμιση προγραμμάτων σπουδών - Διεύρυνση τριτοβάθμιας εκπαίδευσης).

Τμήματα της ερευνητικής εργασίας που περιγράφονται στη διατριβή, πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής της Κτηνιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, στον Τομέα Παθολογικής Ανατομικής και Λοιμωδών Νοσημάτων της Βασιλικής Κτηνιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου του Λονδίνου, στην Κλινική Παραγωγικών Ζώων της Κτηνιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου του Λίβερπουλ, στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Τμήματος Ζωικής Παραγωγής του Τεχνολογικού Εκπαιδευτικού Ιδρύματος Ηπείρου και σε σφαγεία και εκτροφές προβάτων στο νομό Καρδίτσας.

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, υποστηρίζοντας και καθοδηγώντας με σε όλη τη διάρκειά της. Η συμβολή του ήταν καθοριστική στην επιλογή του θέματος, το οποίο εντάσσεται στα πιο σημαντικά ερευνητικά ενδιαφέροντά του. Επίσης, τον ευχαριστώ για την ανεύρεση χρηματικών πόρων μέσω της ένταξής μου σε ένα εξαιρετικό, ανταγωνιστικό ερευνητικό πρόγραμμα, καθώς και για τη συνεχή βοήθειά του σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής. Η υποστήριξή του ήταν πολύ σημαντική για την ολοκλήρωση της διατριβής.

Ευχαριστώ επίσης τον αναπληρωτή καθηγητή της Κτηνιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης κ. Ι. Ταϊτζόγλου για τις πολύτιμες συμβουλές του κατά την έναρξη της διατριβής και για τη συνεχή υποστήριξη και εμπιστοσύνη του στη διάρκεια της εκπόνησής της. Επίσης, ευχαριστώ τον καθηγητή της Κτηνιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης κ. Φ. Σαράτση, για τη συμβολή του ως μέλους της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής της διατριβής.

Ευχαριστίες επίσης απευθύνω:

Στον επίκουρο καθηγητή της Κτηνιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Λίβερπουλ κ. P.J. Cripps, για την πολύτιμη βοήθειά του στους υπολογισμούς και τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Στον επίκουρο καθηγητή της Κτηνιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης κ. Ν. Παπαϊωάννου, για τη σημαντική βοήθειά του σε θέματα ιστοπαθολογικής εξέτασης.

Στη λέκτορα της Βασιλικής Κτηνιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Λονδίνου κ. H. Brooks, για την καθοδήγησή της και την ουσιαστική βοήθειά της στο τμήμα της ιστοπαθολογικής εξέτασης των δειγμάτων.

Στον ομότιμο καθηγητή της Βασιλικής Κτηνιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Λονδίνου κ. J.E.T. Jones για την ευγενική παραχώρηση του στελέχους *Mannheimia haemolytica* ES26L για την πραγματοποίηση των πειραματισμών, καθώς και για τις συμβουλές του.

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 κλινικών και των πειραματικών μελετών.

Στο μέλος ΕΕΔΙΠ κ. Α. Τζιβάρα, για τη βοήθειά της στην εκτίμηση των κυτταρολογικών επιχρισμάτων.

Στους κτηνοτρόφους κ.κ. Χ. Κερασιώτη, Α. Παλιοχωρίτη, Σ. Σιακάρα, Χ. Σιατήρα, για την προθυμία τους να συνεργαστούν, να επιτρέψουν και να βοηθήσουν στη συλλογή δειγμάτων.

Στο διευθυντή του ιστοπαθολογικού τμήματος του νοσοκομείου "Γ. Γεννηματάς" κ. Γ. Κοντογεώργο, για την παραχώρηση εξοπλισμού για τη λήψη φωτογραφιών.

Στον επίκουρο καθηγητή κ. Χ. Μπιλλίνη, για την παραχώρηση εξοπλισμού και για την ιολογική εξέταση των δειγμάτων.

Στον υποψήφιο διδάκτορα κ. Δ. Δούκα, για τη βοήθειά του στις νεκροτομές των ζώων, στη λήψη φωτογραφιών και στην πραγματοποίηση παρασιτολογικής εξέτασης σε ένα κλινικό παραστατικό.

Στον υποψήφιο διδάκτορα κ. Ν. Σολωμάκο, για τη βοήθειά του στην παρασκευή μικροβιολογικών υποστρωμάτων.

Στο μέλος ΕΕΔΙΠ κ. Π. Γκουλέτσου, για τη βοήθειά της σε θέματα επεξεργασίας φωτογραφικού υλικού.

Στην επίκουρη καθηγήτρια κ. Α. Ρόδη, για την παραχώρηση χρήσης εξοπλισμού.

Στον επίκουρο καθηγητή κ. Α. Γκόβαρη, για την παραχώρηση χρήσης εξοπλισμού.

Στην αναπληρώτρια καθηγήτρια κ. Ε. Αθανασοπούλου, για την τεχνική βοήθεια και την παραχώρηση χρήσης εξοπλισμού.

Στην υποψήφια διδάκτορα της Κτηνιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης κ. Γ. Μπρέλλου, για την παρασκευή δειγμάτων για ιστοπαθολογική εξέταση.

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

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

Στον κ. Ε. Κωστόπουλο και στον κ. Α. Τρούκη, για τη φροντίδα των πειραματοζώων.

Στο προσωπικό των σφαγείων Ιάσων ΑΕ και Δημοτικά Σφαγεία Καρδίτσας για τη βοήθεια στη συλλογή δειγμάτων.

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

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

A. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΜΑΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ ΤΗΣ ΘΗΛΗΣ ΤΩΝ ΠΡΟΒΑΤΩΝ

Ο μαστικός αδένας (*glandula mammaria*) και η θηλή (*papilla mammae*) προέρχονται από το εξώδερμα. Ο μαστός (*uber*) της προβατίνας βρίσκεται στην βουβωνική χώρα και το σχήμα του είναι σαν αποπλατυσμένο ημισφαίριο. Ο μαστός απαρτίζεται από δύο μαστικούς αδένες, οι οποίοι χωρίζονται μεταξύ τους με την ευδιάκριτη και αβαθή μεσομαστιαία αύλακα (*sulcus intermammarius*) (Εικόνα I.1). Το δέρμα του μαστού αποτελεί συνέχεια του δέρματος της κοιλιάς και είναι λεπτό, ελαστικό, λιπαρό και καλυπτόμενο από λεπτές τρίχες.

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

Στην κορυφή του σώματος του μαστικού αδένα υπάρχει η θηλή, η οποία έχει σχήμα κωνικό, φέρεται κεφαλικά (Εικόνα I.2) και έχει μήκος 2 έως 2,5 cm σε προβατίνες φυλών κρεοπαραγωγικής κατεύθυνσης (Turner 1952) και 3 έως 3,5 cm σε προβατίνες φυλών γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης (Hatziminaoglou, Zervas, Hatziminaoglou & Sinapis 1984). Στο ελεύθερο άκρο της θηλής υπάρχει το στόμιο του θηλαίου πόρου (*ostium papillarae*) (στόμιο της θηλής). Σημειώνεται ότι η ανατομία της θηλής των προβάτων δεν έχει μελετηθεί επαρκώς. Έτσι, παρακάτω παρουσιάζονται στοιχεία, τα οποία αφορούν και στη θηλή των αγελάδων.

Το τοίχωμα της θηλής αποτελείται από τα παρακάτω τέσσερα στρώματα (από έξω προς τα έσω): το εξωτερικό τοίχωμα ή δέρμα (επιφανειακή επιδερμίδα και δέρμα), το μεσαίο τοίχωμα

ή αγγειακό-μυϊκό τοίχωμα, τη βασική μεμβράνη και το εσωτερικό τοίχωμα (επιθήλιο) (Hamann & Burvenich 1994). Η θηλή καλύπτεται από παχύ στρώμα επιδερμίδας, το οποίο αποτελείται από πολύστιβο πλακώδες κερατινοποιημένο επιθήλιο με λεπτές τρίχες, καθώς και ιδρωτοποιούς και σμηγματογόνους αδένες (Monteiro-Riviere, Stinson & Calhoun 1993). Σε αντίθεση με το δέρμα του μαστού, που είναι ελαφρά προσκολλημένο στους υποκείμενους ιστούς και μπορεί να μετακινείται εύκολα σε σχέση με τον υποκείμενο μαστικό ιστό, το δέρμα της θηλής είναι ακίνητο και ισχυρά προσκολλημένο στο μυϊκό στρώμα. Η επιφάνειά του είναι έτσι διαμορφωμένη, ώστε να αντέχει στην ασκούμενη κατά το θηλασμό ή την άρμεξη μηχανική πίεση.

Στις αγελάδες η επιδερμίδα της θηλής είναι ιδιαίτερα παχιά (1 mm), προστατεύεται από την κεράτινη στιβάδα του δέρματος, η οποία αποτελεί ένα συμπαγές στρώμα πάχους 100 μm, και περιλαμβάνει πολλά αλληλοεπικαλυπτόμενα στρώματα νεκρών κεράτινων σχηματισμών. Επιπλέον, το υποκείμενο τμήμα της κεράτινης στιβάδας είναι έντονα θηλώδες (Hibbitt 1984). Η επιδερμίδα της θηλής είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη, καθώς περιέχει πολλές αισθητικές νευρικές απολήξεις που προέρχονται από το οσφυϊκό νεύρο και καταλήγουν σε βάθος 200 μm από την εξωτερική επιφάνεια. Μέσω αυτών μεταφέρονται νευρικές ώσεις στο κεντρικό νευρικό σύστημα, με αποτέλεσμα την έκλυση της ωκυτοκίνης και τη μεταφορά της στο μαστικό αδέν, όπου δρα στα μωοεπιθηλιακά κύτταρα. Στα βαθύτερα στρώματα του δέρματος υπάρχει πυκνό κολλαγόνο, που περιβάλλει δεσμίδες λείων μυϊκών ινών, οι οποίες κατανέμονται επιμήκως (Hamann & Burvenich 1994).

Το αγγειακό-μυϊκό στρώμα αποτελεί περίπου τα δύο τρίτα του τοιχώματος της θηλής και μέσα σε αυτό περιλαμβάνονται τα αγγεία της θηλής: αρτηρίες, αρτηριοφλεβικές αναστομώσεις, φλέβες και λεμφαγγεία. Η αναλογία επιμήκων / κυκλοτερών μυϊκών ομάδων στο τοίχωμα της θηλής διαφοροποιείται ανάλογα με την περιοχή της θηλής (Hamann & Burvenich 1994).

Η βασική μεμβράνη μοιάζει με αυτήν του δέρματος, όσον αφορά στα ινοελαστικά στοιχεία της, αλλά περιέχει πολύ περισσότερα τριχοειδή αγγεία, τα οποία χρησιμεύουν για την παροχή θρεπτικών συστατικών στο επιθήλιο του θηλαίου πόρου (Hamann & Burvenich 1994).

Στο στόμιο της θηλής απολήγει εσωτερικά ο θηλαίος πόρος (*ductus papillaris*) μήκους έως 4 mm. Αυτός καλύπτεται από παχύ κερατινοποιημένο πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο κατανεμημένο σε πολυάριθμες πτυχές, οι οποίες ενώνονται στο κέντρο του πόρου (Hibbitt 1984). Στις αγελάδες, ο βλεννογόνος του θηλαίου πόρου συχνά έχει σκούρο χρωματισμό και στο ανώτερο σημείο του είναι σαφώς διαχωρισμένος από το θηλαίο κόλπο μέσω κάποιων πτυχών, οι οποίες σχηματίζουν ένα εσωτερικό στόμιο (Εικόνα 1.3). Παραδοσιακά, το μόρφωμα αυτό αποκαλείται "δακτύλιος του Furstenberg" (Furstenberg's rosette) (Hibbitt 1984).

Στην περιοχή αυτή τα κύτταρα της επιφάνειας γίνονται πιο στρογγυλά και εξέχοντα, με αραιές μικρολάχνες. Στη θηλή των αγελάδων βρίσκεται ένας "λεμφοεπιθηλιακός ιστός" (*lymphoepithelium*) με σημαντική δράση όσον αφορά στα αντιγόνα που εισβάλλουν στην περιοχή (Hibbitt 1984). Ανάλογα ευρήματα δεν έχουν αναφερθεί σε προβατίνες.

Στις αγελάδες, βρίσκονται αρκετές ενδείξεις που συνηγορούν στην άποψη ότι υπάρχει μια περιοχή του θηλαίου πόρου που δρα ως σφιγκτήρας μυς. Το μεγαλύτερο τμήμα των λείων μυϊκών ινών ολόκληρης της θηλής κατανέμεται σε σπειροειδές ή κωνοειδές σύμπλεγμα μυϊκών ινών, το οποίο ξεκινά από τη βάση της θηλής και ολοκληρώνεται γύρω από το θηλαίο πόρο. Αυτό το σύμπλεγμα δρα ως σφιγκτήρας, κλείνοντας με τον τρόπο αυτό το θηλαίο πόρο, ώστε οι τυχόν διαρροές μαστικού εκκρίματος ή η είσοδος μικροβίων να είναι ελάχιστες (Hamann & Burvenich 1994). Στις προβατίνες δεν υπάρχει σφιγκτήρας μυς της θηλής, η σύγκλειση της οποίας επιτυγχάνεται με ελαστικό ιστό (Μιχαήλ 1990, Schummer και συν. 1981).

Στο θηλαίο πόρο απολήγει ο θηλαίος κόλπος (*sinus papillaris*), ο οποίος έχει έξω (κατώτερο) άκρο πολύ στενό, ενώ το ανώτερο άκρο του ομοιάζει με σάκκο (Εικόνα 1.3). Ο θηλαίος κόλπος καλύπτεται από δίστιβο κυλινδρικό επιθήλιο.

Στο θηλαίο κόλπο απολήγει ο ακανόνιστου σχήματος, μεγέθους φουντουκιού και καλυπτόμενος από δίστιβο κυλινδρικό επιθήλιο γαλακτοφόρος κόλπος (*sinus lactiferous*) του μαστικού αδένος. Η χωρητικότητα του γαλακτοφόρου κόλπου κυμαίνεται από 20 έως 80 ml μαστικού εκκρίματος. Στο γαλακτοφόρο κόλπο απολήγουν 10 έως 15 γαλακτοφόροι πόροι (*ducti lactiferi*), οι οποίοι καλύπτονται από δίστιβο κυλινδρικό επιθήλιο. Τέλος, σε κάθε γαλακτοφόρο πόρο εκβάλλουν πολλοί μεσολόβιοι πόροι (Turner 1952, Μιχαήλ 1990).

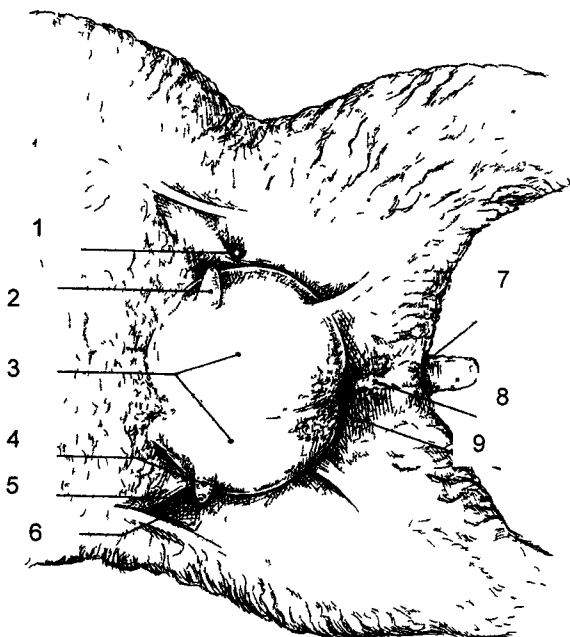
Ο κάθε μαστικός αδένος είναι ένας σωληνοκυψελοειδής εξωκρινής αδένος. Ο αδενικός ιστός αποτελείται από λοβούς, οι οποίοι σχηματίζονται από λόβια. Οι μεσολόβιοι πόροι διακλαδίζονται σε αδενοσωλήνες, οι οποίοι καταλήγουν σε εκκριτικές αδενοκυψελίδες. Οι αδενοσωλήνες και οι εκκριτικές αδενοκυψελίδες καλύπτονται από μονόστιβο κυβοειδές επιθήλιο (μαστικά επιθηλιακά κύτταρα ή μαστικά εκκριτικά κύτταρα) (Εικόνα 1.4).

Τα λόβια και οι λοβοί του μαστικού αδένος συγκρατούνται μεταξύ τους με συνδετικό ιστό διηθούμενο από λίπος. Ο ενδολόβιος συνδετικός ιστός περιβάλλει τις εκκριτικές αδενοκυψελίδες και τους μικρούς εκφορητικούς πόρους, ενώ ο μεσολόβιος συνδετικός ιστός περιέχει αιμοφόρα αγγεία, λεμφικά αγγεία, ελαστικές ίνες και μωεπιθηλιακά κύτταρα (Μιχαήλ 1990, Schummer και συν. 1981). Γύρω από κάθε αδενοκυψελίδα βρίσκονται μωεπιθηλιακά κύτταρα, που χρησιμεύουν για την έκθλιψη της και την έξοδο του μαστικού εκκρίματος από αυτή (Linzell 1952, Merham 1983).

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

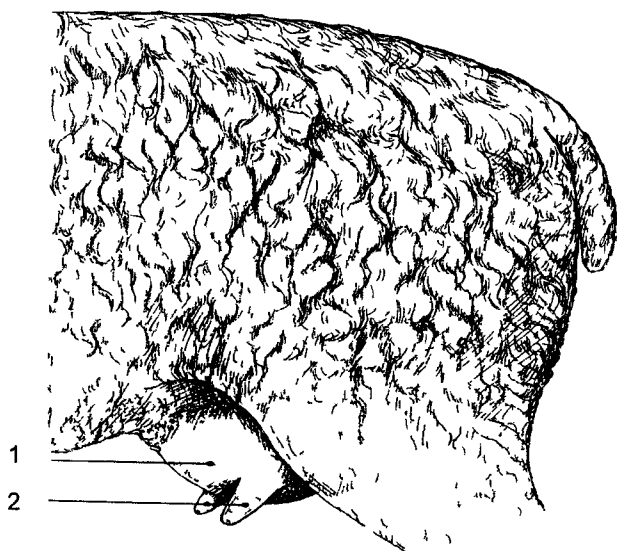
Στο μαστικό αδένα υπάρχουν οκτώ έως δώδεκα μεγάλα απαγωγά λεμφικά αγγεία, τα οποία εκβάλλουν στα μαστικά (ή οπισθομαστικά ή υπερμαστικά) λεμφογάγγλια (*lymphonodi mammarii*) (Lee & Lascelles 1969), τα οποία αποτελούν τα επιχώρια λεμφογάγγλια του οργάνου. Το λεμφικό σύστημα της θηλής αποτελείται από ένα επιφανειακό και ένα βαθύ δίκτυο (Hampl & Jelínek 1971). Τα λεμφικά τριχοειδή αγγεία του δέρματος της θηλής εμφανίζουν ένα πολυγωνικό δίκτυο στο χόριο. Τα αγγεία αυτά διαβαίνουν μέσα από βαθειά στρώματα του χορίου και συναντούν το αγγειακό-μυϊκό στρώμα του τοιχώματος της θηλής, όπου συνδέονται με φλέβες με μέση διάμετρο 250 έως 300 μm. Αυτές είναι λεμφικές φλέβες, οι οποίες τελικά ενώνονται με μεγαλύτερες φλέβες με διάμετρο μεγαλύτερη από 1 mm, οι οποίες διατρέχουν το μέσο του τοιχώματος της θηλής σε επιμήκη κατεύθυνση. Αυτό το μεγάλο λεμφικό πλέγμα της θηλής (*lymphatic corpus cavernosum*) συντελεί στη διόγκωση των θηλών κατά τη διάρκεια του θηλασμού ή της άρμεξης (Tagand 1932).

Ο μαστικός αδένας νευρώνεται από το λαγονοβουβωνικό νεύρο και το αιδοιομηρικό νεύρο, τα οποία διανέμονται στο μαστικό παρέγχυμα και το δέρμα του μαστού. Στο μαστικό αδένα εισδύουν επίσης συμπαθητικά νευρονημάτια, που διανέμονται στο δέρμα, τις λείες μυϊκές ίνες, το τοίχωμα των αγγείων και τον αδενικό ιστό (Findlay 1971, Linzell 1971, Μιχαήλ 1990).



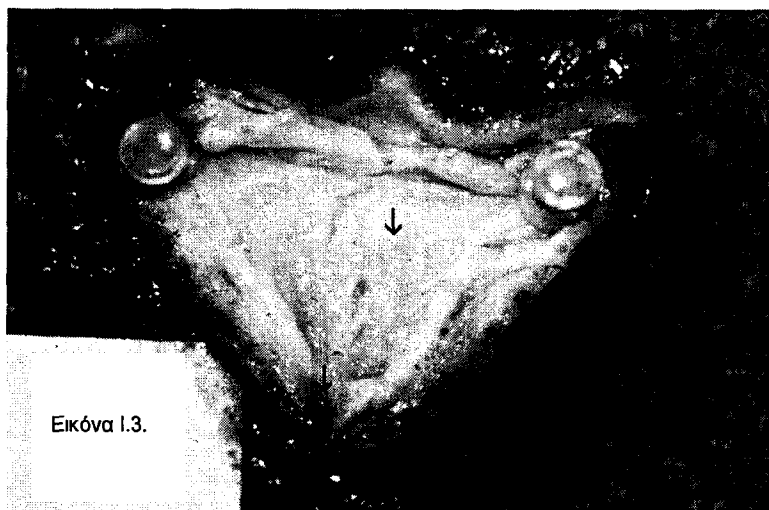
Εικόνα 11. Σχηματική απεικόνιση του μαστού προβατίνας (Barone 2001)

1 βουβωνική πτυχή, 2 θηλή, 3 μαστικοί αδένες, 4 θηλή, 5 στόμιο του θηλαίου πόρου, 6 βουβωνική πτυχή, 7 αιδοίο, 8 περίνεο, 9 μεσομάστια αύλακα



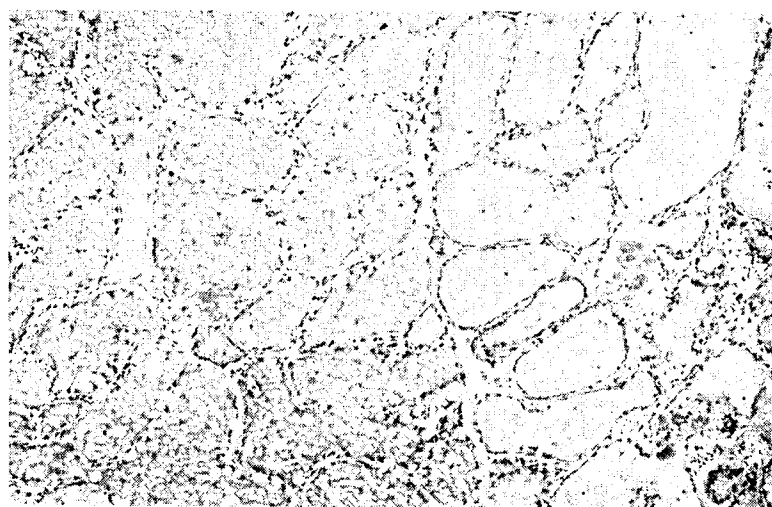
Εικόνα 12 Πλάγια σχηματική απεικόνιση του μαστού προβατίνας (Barone 2001)

1 μαστικός αδένας, 2 θηλές



Εικόνα 1.3. Εσωτερικό
φυσιολογικής
προβατίνας. Θηλής

άνω βέλος: θηλαίος κόλπος,
κάτω βέλος: θηλαίος πόρος



Εικόνα 1.4. Ιστολογική τομή
παρεγχύματος υγιούς
μαστικού αδένος προβατίνας
(Fthenakis 1988).

B. ΜΑΣΤΙΤΙΔΑ ΤΩΝ ΠΡΟΒΑΤΩΝ

Εισαγωγή

Μαστίτιδα είναι η φλεγμονή του μαστικού αδένου, η οποία οφείλεται σε διάφορα βακτήρια και χαρακτηρίζεται από ύπαρξη μικροοργανισμών και αύξηση του αριθμού των λευκοκυττάρων στο μαστικό έκκριμα, καθώς και από παθολογικής φύσεως αλλαγές στο μαστικό ιστό (Schalm και συν. 1971). Η μαστίτιδα είναι η πιο σημαντική ασθένεια του μαστικού αδένου.

Η μαστίτιδα είναι ένα από τα σημαντικότερα νοσήματα στις προβατοτροφικές εκμεταλλεύσεις, ιδιαίτερα δε σε αυτές γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης, καθώς έχει σημαντικές οικονομικές συνέπειες (Radostits, Blood & Gay 2000).

Στην πλειονότητα των περιπτώσεων, η μαστίτιδα είναι το αποτέλεσμα εισβολής βακτηρίων στο μαστικό αδένου μέσω της θηλής του. Εάν το εσωτερικό περιβάλλον του μαστικού αδένου είναι ευνοϊκό, τα μικρόβια πολλαπλασιάζονται, "ερεθίζουν" το μαστικό ιστό και επακολουθεί φλεγμονώδης αντίδραση. Μαστίτιδα μπορεί όμως να προκληθεί και μετά από κάποιο τραύμα και λιγότερο συχνά, λόγω αλλεργίας ή νεοπλασίας (Menzies 2000). Εάν κάποιος μαστικός αδένος φλεγμαίνει χωρίς να ανιχνεύεται ενδομαστική μόλυνση, τότε πιθανόν αυτός να έχει τραυματιστεί ή να βρίσκεται στο στάδιο της αποδρομής μιας ενδομαστικής μόλυνσης, η οποία αυτοπεριορίστηκε, ή η ενδομαστική μόλυνση να μην οφείλεται σε βακτήρια ή τέλος, να έχει γίνει λανθασμένη δειγματοληψία ή βακτηριολογική εξέταση (Menzies 2000).

Σημασία της μαστίτιδας

Η μαστίτιδα προξενεί σημαντικές οικονομικές επιπτώσεις στις προβατοτροφικές εκμεταλλεύσεις (Watson & Buswell 1984, Bor, Winkler & Gootwine 1989), οι οποίες οφείλονται στα παρακάτω αίτια.

- α. Θάνατος ασθενών θηλυκών ζώων.
- β. Απώλεια της λειτουργίας ενός μαστικού αδένου και ανάγκη πρόωρης απομάκρυνσης θηλυκών ζώων (Madel 1981, Watson & Buswell 1984).
- γ. Έξοδα αντικατάστασης των ζώων που απομακρύνονται πρόωρα. Το ποσοστό των ζώων που απομακρύνονται στο τέλος της γαλακτικής περιόδου, εξαιτίας κλινικής μαστίτιδας φθάνει έως 5%

(Barillet, Rupp, Mignon-Grasteau, Astruc & Jacquin 2001, Bergonier & Berthelot 2003, Bergonier, De Cremoux, Rupp, Lagriffoul & Berthelot 2003).

δ. Κτηνιατρικές δαπάνες.

ε. Μειωμένη γαλακτοπαραγωγή προβάτων, η οποία σε ζώα φυλών γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης μπορεί να φθάσει έως 55% (Saratsis, Alexopoulos, Tzora & Fthenakis 1999).

στ. Αυξημένη θνησιμότητα και μικρότερη από την κανονική αύξηση βάρους των αμνών (Johnston, MacLachlan & Murray 1980, Kirk, Huffman & Anderson 1980, Bassam & Hasso 1987, Fthenakis & Jones 1990α, Ahmad, Timms, Morrical & Brackelsberg 1992, Keisler, Andrews & Moffatt 1992, Larsgard & Vaabenoe 1993, Kirk & Glenn 1996).

ζ. Υποβάθμιση της ποιότητας του γάλακτος. Σε περιπτώσεις μαστίτιδας αναφέρεται μείωση της συγκέντρωσης του λίπους, της λακτόζης και των καζεϊνών στο γάλα (Torres-Hernandez & Hohenboken 1979, McCarthy, Lyndsey, Gore & Notter 1988, Deutz, Schuh, Planner & Fuchs 1995, Burriel 1997, Leitner, Chaffer, Caraso, Ezra, Kababea, Winkler, Glickman & Saran 2003, Leitner, Chaffer, Shamay, Shapiro, Merin, Ezra, Saran & Silanikove 2004).

η. Απόρριψη μαστικού εκκρίματος που είναι ακατάλληλο για ανθρώπινη κατανάλωση. Μαστικό έκκριμα από προβατίνες με μαστίτιδα μπορεί να περιέχει κάποιο(α) από τα παρακάτω βακτήρια ή κάποια(ες) από τις τοξίνες, τις οποίες αυτά παράγουν, με πιθανό αποτέλεσμα την προσβολή της υγείας των ανθρώπων που θα το καταναλώσουν: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Coxiella burnetii*, *Yersinia enterocolitica*, *Brucella melitensis*, *Streptococcus faecalis* (Gogov, Peeva & Slavchev 1984, Ariznabarreta, Gonzalo & San Primitivo 2002, Schoder, Winter, Kareem, Baumgartner & Wagner 2003, Vautor, Abadie, Guibert, Huard & Pepin 2003). Σημειώνεται ότι καθώς το πρόβειο γάλα χρησιμοποιείται κυρίως για την παραγωγή τυριών και γιαούρτης, τα πρόβεια γαλακτοκομικά προϊόντα μπορεί επίσης να είναι επικίνδυνα.

θ. Μειωμένη γονιμότητα των προσβεβλημένων ζώων. Καθώς στις προβατίνες ο μαστικός αδένας είναι πηγή οιστραδιόλης 17-β, η μείωση της έκκρισής της σε περιπτώσεις μαστίτιδας, πιθανόν συμβάλλει στη μείωση της γονιμότητας των ζώων (Walker 1984). Επιπλέον, οι Soto, Natzke και Hansen (2003) ανέφεραν ότι ζώα με μαστίτιδα είχαν μειωμένη γονιμότητα, λόγω αυξημένου ποσοστού εμβρυϊκών θανάτων, αν και οι μηχανισμοί με τους οποίους λαμβάνουν χώρα οι εμβρυϊκές απώλειες, δεν ήταν σαφείς. Πιθανόν, σημαντικό ρόλο παίζουν οι κυτοκίνες, καθώς αυτές προκαλούν υπερθερμία, παραγωγή προσταγλαδινών, παρεμπόδιση της έκκρισης της ωχρινοτρόπου ορμόνης και κατ' επέκταση, μείωση της συγκέντρωσης προγεστερόνης, καθιστώντας έτσι τη διατήρηση της εγκυμοσύνης αδύνατη.

Επιπλέον η ασθένεια αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα μείωσης της ευζωίας των ζώων στις προβατοτροφικές εκμεταλλεύσεις. Η κλινική μαστίτιδα είναι ιδιαίτερα επώδυνη. Έτσι, έχουν αναφερθεί κάποιες σκέψεις ευθανασίας των ζώων, στα οποία η ασθένεια κρίνεται μη ιάσιμη (Fitzpatrick, Scott & Nolan 2005).

Συχνότητα της μαστίτιδας στην Ελλάδα

Οι Ταρλατζής, Φραγκόπουλος και Στοφόρος (1963) ήταν οι πρώτοι που μελέτησαν τη μαστίτιδα των προβάτων στην Ελλάδα. Ισχυρίστηκαν ότι το αίτιο της "γαγγραινώδους" μορφής της νόσου ήταν το βακτήριο *Clostridium perfringens* τύπος C.

Ο Χριστοδούλου (1969) απέδωσε την ασθένεια στο βακτήριο *S. aureus* και ανέφερε ότι η συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας στις εκτροφές στην Ελλάδα κυμαινόταν από 20 έως 30%, ενώ το ποσοστό θνησιμότητας μπορούσε να φτάσει έως 80%.

Ο Ρώσσης (1972) εξέτασε 179 προβατίνες με κλινικά φυσιολογικό έκκριμα στην περιοχή της Αττικής. Μετά από βακτηριολογική εξέταση, απομονώθηκαν βακτήρια από το 32% των δειγμάτων, από το 43% των προβάτων. Από τα βακτήρια που απομονώθηκαν, 58% ήταν πηκτάση-αρνητικοί σταφυλόκοκκοι και 28% ήταν *S. aureus*. Επιπλέον, αλλοιώσεις χρόνιας μαστίτιδας βρέθηκαν στο 5% των προβάτων.

Οι Ρώσσης, Σεϊμένης και Μενασσή (1972) πραγματοποίησαν βακτηριολογική εξέταση μαστικού εκκρίματος σε 130 προβατίνες με κλινική μαστίτιδα, από έναν πληθυσμό 1010 (13%) προβάτων στην περιοχή της Αττικής. Από όλα τα δείγματα απομονώθηκε σε καθαρή καλλιέργεια *S. aureus*, οπότε οι συγγραφείς πρότειναν την παραγωγή ενός εμβολίου με στόχο την πρόληψη της νόσου.

Ο Αδαμίδης (1980) εξέτασε έναν πληθυσμό 1413 προβάτων στην περιοχή της Μακεδονίας και βρήκε 101 περιστατικά (7%) "γαγγραινώδους" μαστίτιδας.

Οι Υψηλάντης, Σαρρής και Παπαδόπουλος (1988) απομόνωσαν μικρόβια (κυρίως πηκτάση-αρνητικούς Σταφυλοκόκκους και *S. aureus*) από το 37,5% 152 δειγμάτων μαστικού εκκρίματος κλινικά υγιών προβάτων.

Οι Φθενάκης και Jones (1990) παρουσίασαν τα αποτελέσματα μίας μελέτης στη συχνότητα και την αιτιολογία της κλινικής μαστίτιδας σε 36 εκτροφές με 5498 προβατίνες στην Κεντρική Μακεδονία, κατέγραψαν δε συχνότητα της ασθένειας 11%. *Mycoplasma* spp. και *S. aureus* ήταν τα συχνότερα απομονωθέντα μικρόβια από δείγματα μαστικού εκκρίματος.

Ο Φθενάκης (1992) παρουσίασε μία ανασκόπηση της μέχρι τότε ελληνικής και διεθνούς βιβλιογραφίας στη μαστίτιδα των προβάτων.

Ο Fthenakis (1994) πραγματοποίησε μία μελέτη της υποκλινικής μαστίτιδας σε οκτώ εκτροφές με 760 προβατίνες στη Νότια Ελλάδα και βρήκε ότι το ποσοστό προσβολής κυμαινόταν από 5% έως 17%, ανάλογα με το στάδιο της γαλακτικής περιόδου. Οι κύριοι αιτιολογικοί παράγοντες της ασθένειας ήταν πηκτάση-αρνητικοί Σταφυλόκοκκοι.

Οι Stefanakis, Boscós, Alexopoulos και Samartzi (1995) πραγματοποίησαν μία μελέτη της υποκλινικής μαστίτιδας στη Βόρεια Ελλάδα και βρήκαν ότι το ποσοστό προσβολής κυμαινόταν από 29% έως 43%, ανάλογα με την εκτροφή και τη φυλή των προβάτων. Οι κύριοι αιτιολογικοί παράγοντες της ασθένειας ήταν πηκτάση-αρνητικοί σταφυλόκοκκοι και *S. aureus*.

Οι Fthenakis, Saratsis, Tzora και Linde (1998) παρουσίασαν περιστατικά υποκλινικής μαστίτιδας στην Πελοπόννησο και την Ήπειρο, οφειλόμενα σε *L. monocytogenes*.

Οι Saratsis, Leontides, Tzora, Alexopoulos και Fthenakis (1998) μελέτησαν τα προβλήματα σε μαστικούς αδένες σε προβατίνες κατά την ξηρά περίοδό τους σε 10 κοπάδια στη Δυτική Ελλάδα. Έτσι, βρήκαν ότι η συσσωρευτική πιθανότητα προσβολής ήταν 5%.

Ο Κοτανίδης (2003) μελέτησε την εξέλιξη της υποκλινικής μαστίτιδας σε τρεις εκτροφές στη Μακεδονία. Πηκτάση-αρνητικοί Σταφυλόκοκκοι και *Corynebacterium* spp. ήταν τα συχνότερα απομονωθέντα μικρόβια από δείγματα μαστικού εκκρίματος.

Οι Ζδράγκας, Τσάκος, Κοτζαμανίδης, Ανατολιώτης και Τσακνάκης (2005) παρουσίασαν περιστατικά μαστίτιδας σε επτά εκτροφές στη Θεσσαλία, τα οποία οφείλονταν σε *Streptococcus agalactiae*.

Κλινική εκδήλωση

Στις προβατίνες, η μαστίτιδα παρουσιάζεται με κλινική μορφή, η οποία εμφανίζεται με μία ποικιλία κλινικών συμπτωμάτων και με υποκλινική μορφή, στην οποία η φλεγμονή του μαστικού αδένου δε συνοδεύεται από κλινικές εκδηλώσεις (Schalm και συν. 1971, Kirk & Glenn 1996).

Με κριτήρια ταξινόμησης τη διάρκεια και τη βαρύτητα της ασθένειας, διακρίνονται τρεις μορφές κλινικής μαστίτιδας: η υπεροξεία, η οξεία και η χρόνια (Quinlivan 1968, Clark 1980, Calavas, Bugnard, Ducrot & Sulrice 1998). Στην υπεροξεία μορφή, παρουσιάζονται μαστικά και γενικά κλινικά συμπτώματα: πυρετός (>41,0 °C), ταχυκαρδία, απάθεια, απουσία μηρυκασμού, μυϊκή αδυναμία, μυϊκός τρόμος και απώλεια της όρεξης. Η εκδήλωση των κλινικών συμπτωμάτων είναι απότομη και η πορεία της ασθένειας ταχύτατη. Είναι δυνατόν τα ζώα να έχουν αρμεχθεί το

απόγευμα και να βρεθούν νεκρά το επόμενο πρωί. Συνήθως, η υπεροξεία κλινική μαστίτιδα καταλήγει σε θάνατο του ασθενούς ζώου.

Η οξεία μαστίτιδα παρουσιάζεται κυρίως με μαστικά συμπτώματα και, πιο σπάνια, με ελαφρά γενικά συμπτώματα. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων, μαστικά συμπτώματα παρουσιάζονται μόνο σε ένα μαστικό αδέν. Το πρώτο σύμπτωμα είναι η αλλοίωση του μαστικού εκκρίματος. Στην αρχή, το έκκριμα έχει αυξημένο ιξώδες ή περιέχει νιφάδες ή πήγματα και αργότερα γίνεται ορώδες, πυώδες, οροαιματηρό ή αιματηρό. Η χλωτότητα αποτελεί χρήσιμο σημείο για την αναγνώριση ασθενών ζώων σε κάποιο κοπάδι. Ο προσβεβλημένος μαστικός αδένας είναι ζεστός, εξοιδημένος, σκληρός και επώδυνος και αργότερα γίνεται κυανωτικός. Τα επιχώρια λεμφογάγγλια είναι διογκωμένα. Η αλλαγή χρώματος στο δέρμα αρχίζει από το δέρμα της θηλής και, προοδευτικά, εξαπλώνεται στο δέρμα όλου του αδέν και μερικές φορές και στο κοιλιακό ή το εσωτερικό μηριαίο τοίχωμα. Στη συνέχεια, η περιοχή γίνεται κυανωτική και συνοδεύεται από υποδόριο εμφύσημα. Επίσης, είναι πιθανή η εκδήλωση μαστίτιδας και στον άλλο μαστικό αδέν.

Η ασθένεια μπορεί να καταλήξει σε νέκρωση του μαστικού αδέν, η οποία συνήθως αρχίζει από την περιοχή γύρω από τη θηλή, και σε απόπτωση τμήματος μαστικού ιστού ακολουθούμενη από επούλωση, η οποία γίνεται με ουλοποίηση. Άλλη πιθανή κατάληξη της ασθένειας είναι ο σχηματισμός αποστημάτων στο μαστικό παρέγχυμα, τα οποία μερικές φορές καταλήγουν σε αναζωπύρωσή της. Η μετάπτωση της κλινικής μαστίτιδας σε υποκλινική είναι μία τρίτη πιθανή κατάληξή της (Quinlivan 1968, Schalm και συν. 1971, Clark 1980, Blood, Radostis & Henderson 1983, El-Masannat 1987, Fthenakis 1988, Fthenakis & Jones 1990β).

Η "μαστίτιδα της ξηράς περιόδου" ανιχνεύεται συνήθως κατά την εξέταση των θηλυκών ζώων στο τέλος της γαλακτικής περιόδου ή αμέσως μετά τον τοκετό τους (Quinlivan 1968, Duffy 1983). Η μορφή αυτή παρουσιάζεται συνήθως με ενδομαστικά αποστήματα, διάχυτη σκλήρυνση, ογκίδια, οζίδια και κύστες στο μαστικό παρέγχυμα (Saratsis και συν. 1998), προχωρεί με αργό ρυθμό, δεν παρουσιάζει έντονα κλινικά συμπτώματα και διαπιστώνεται με ενδελεχή κλινική εξέταση των ζώων. Θεωρείται ότι η μαστίτιδα της ξηράς περιόδου δεν καταλήγει σε θάνατο του ζώου. Είναι επίσης πιθανόν οι ανιχνευόμενες περιπτώσεις μαστίτιδας ξηράς περιόδου να είναι ελαφράς μορφής περιπτώσεις χρόνιας μαστίτιδας, οι οποίες δεν είχαν ανιχνευτεί στην οξεία φάση τους (δηλαδή κατά τη γαλακτική περίοδο), αλλά ανιχνεύτηκαν στη χρόνια (δηλαδή κατά την ενδελεχή κλινική εξέταση των προβάτων στο τέλος της γαλακτικής περιόδου) (Orphanou 1987, Saratsis και συν. 1998).

Στην υποκλινική μαστίτιδα δεν παρουσιάζονται κλινικά συμπτώματα. Τα χαρακτηριστικά της ευρήματα είναι η απομόνωση βακτηρίων, η αύξηση των λευκοκυττάρων στο μαστικό έκκριμα

και η μείωση της γαλακτοπαραγωγής. Αυτή η μείωση οφείλεται κυρίως στην καταστροφή των επιθηλιακών κυττάρων του μαστικού παρεγχύματος (Fthenakis & Jones 1990β, Watkins 1990). Επίσης, παρατηρείται μείωση της περιεκτικότητας του μαστικού εκκρίματος σε λίπος, λακτόζη και καζεΐνες, καθώς και αύξηση της περιεκτικότητάς του σε ολικές πρωτεΐνες (Margetin, Capistrak, Kica, Valkovsky & Foltys 1993, Leitner και συν. 2004). Επιπλέον, αναφέρεται αύξηση της συγκέντρωσης της πλασμίνης, του ενεργοποιού του πλασμινογόνου, της N-ακετυλο-D-γλυκοσαμινάσης, της αλκαλικής φωσφατάσης και της δεϋδρογονάσης της λακτόζης στο μαστικό έκκριμα ζώων με υποκλινική μαστίτιδα (Batavani, Mortaz, Falahian & Dawoodi 2003). Η υποκλινική μαστίτιδα εκδηλώνεται συνήθως με χρόνια μορφή, διότι δεν αντιμετωπίζεται, επειδή δε διαγιγνώσκεται έγκαιρα. Σημειώνεται ότι είναι πιθανόν η υποκλινική μαστίτιδα να μετατραπεί σε κλινική (Fthenakis 1988, Fthenakis & Jones 1990β).

Οι κλινικές εκδηλώσεις της ασθένειας δε συσχετίζονται με κάποιο συγκεκριμένο αιτιολογικό παράγοντα, καθώς η μόλυνση από κάποιο βακτήριο μπορεί να εκδηλωθεί με μία ποικιλία μαστικών ή γενικευμένων συμπτωμάτων. Επίσης, κάποιο συγκεκριμένο κλινικό σύμπτωμα μπορεί να εκδηλωθεί κατά τη μόλυνση από διάφορα βακτήρια (Fthenakis 1988, El-Masannat 1987, Watkins 1990).

Περιστατικά κλινικής μαστίτιδας μπορεί να παρατηρηθούν οποιαδήποτε στιγμή της γαλακτικής περιόδου. Όμως, αυξημένη συχνότητα εμφάνισης κλινικής μαστίτιδας φαίνεται ότι υπάρχει συνήθως αμέσως μετά τον απογαλακτισμό των αμνών και την έναρξη της άρμεξης (Jones JET 1985, Φθενάκης & Jones 1990, Bergonier & Berthelot 2003). Επιπλέον, η μαστίτιδα της ξηράς περιόδου συνήθως γίνεται αντιληπτή κατά τον επόμενο τοκετό (Menzies 2000, Menzies & Ramanoon 2001).

Αιτιολογικοί παράγοντες

Τα παρακάτω μικρόβια είναι οι συνηθέστεροι αιτιολογικοί παράγοντες της μαστίτιδας των προβάτων.

Σταφυλόκοκκοι

Το βακτήριο *S. aureus* subsp. *aureus* ("*S. aureus*") είναι ο πιο σημαντικός αιτιολογικός παράγοντας κλινικής μαστίτιδας σε αρμεγόμενες προβατίνες (Aguilar & Iturralde 2001, Bergonier & Berthelot 2003). Απομονώνεται επίσης από περιστατικά μαστίτιδας σε προβατίνες

κρεατοπαραγωγικής κατεύθυνσης (Jones JET 1985, Bergonier & Berthelot 2003). Σε πολλά άρθρα έχει επιβεβαιωθεί ο σημαντικός ρόλος του στην αιτιολογία της ασθένειας (Nocard 1887, Pegreff 1963, Landau & Tamarin 1973, Jones 1991). Το βακτήριο προκαλεί από υποκλινική έως υπεροξεία μαστίτιδα (Bergonier & Berthelot 2003). Παράγοντες, με τους οποίους το βακτήριο ασκεί την παθογόνο δράση, είναι η α-τοξίνη, η πηκτάση, η πρωτεΐνη Α, η λευκοκτονίνη, τα τειχοϊκά/τειχουρονικά οξέα, οι πολυσακχαρίτες της κυτταρικής μεμβράνης, η συγκολλητίνη και οι πεπτιδογλυκάνες (Vitkov 1984, Burriel & Dagnall 1997, Vautor και συν. 2003). Στελέχη *S. aureus* subsp. *anaerobius* σπάνια απομονώνονται από περιπτώσεις μαστίτιδας (De La Fuente, Ruiz Santa Quiteria, Cid, Domingo & Suarez 1993).

Οι πηκτάση-αρνητικοί Σταφυλόκοκκοι είναι οι πιο σημαντικοί αιτιολογικοί παράγοντες υποκλινικής μαστίτιδας (El-Masannat 1987, Fthenakis 1988, Watkins, Burriel & Jones 1991, McDougall, Pankey, Delaney, Barlow, Patricia, Murdough & Scruton 2002, Bergonier & Berthelot 2003). Μπορούν επίσης να προκαλέσουν κλινική μαστίτιδα. Τα είδη πηκτάση-αρνητικών Σταφυλοκόκκων που έχουν απομονωθεί πιο συχνά από περιπτώσεις μαστίτιδας σε προβατίνες είναι (αλφαβητικά): *S. caprae*, *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. equorum* subsp. *equorum*, *S. fleurettii*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* subsp. *hominis*, *S. lentus*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri* subsp. *sciuri*, *S. simulans*, *S. warneri*, *S. xylosus* (Deinhofer & Pernthaner 1993, Fthenakis, Marples, Richardson & Jones 1994, Burriel 1998, Las Heras, Dominguez & Fernandez-Garayzabal 1999, Winter, Rammelmayer & Baumgartner 2002). Ειδικοί παράγοντες με τους οποίους τα βακτήρια αυτά ασκούν την παθογόνο δράση τους για το μαστικό αδένα δεν έχουν ταυτοποιηθεί.

Mannheimia haemolytica και *Pasteurella trehalosi*

Το βακτήριο *M. haemolytica* είναι ο πιο σημαντικός αιτιολογικός παράγοντας κλινικής μαστίτιδας σε εκτροφές προβάτων κρεατοπαραγωγικής κατεύθυνσης (El-Masannat 1987, Watkins 1990), προκαλεί δε συνήθως κλινική μαστίτιδα (Shoop & Myers 1984, El-Masannat 1987).

Το βακτήριο υπάρχει ως φυσιολογική βακτηριακή χλωρίδα, στην ανώτερη αναπνευστική οδό και στη στοματική κοιλότητα των προβάτων. Πιστεύεται ότι πιθανόν μεταφέρεται από τη στοματική κοιλότητα των αμνών στις θηλές των προβάτων και στη συνέχεια, στους μαστικούς αδένες (Gunning & Davies 1989, Scott & Jones 1998). Πάντως, αν και σε *in vitro* μελέτες επιβεβαιώθηκε η δυνατότητα του βακτηρίου να προσκολλάται στα μαστικά επιθηλιακά κύτταρα (Vilela, Fitzpatrick & Morgan 2004), η υπόθεση αυτή δεν έχει επιβεβαιωθεί.

Σε πειραματικές μελέτες έγινε δυνατή η αναπαραγωγή κλινικής μαστίτιδας, παρόμοιας προς την κλινική νόσο, μετά από ενοφθαλμισμό πολύ μικρού αριθμού (10 βακτηριακών κυττάρων) ενός στελέχους (ES26L) που απομονώθηκε από περιστατικό κλινικής μαστίτιδας στη Νότια Αγγλία (El-Masannat 1987, El-Masannat, Jones & Scott 1991, Vaz 1994). Σημειώνεται ότι για την επιτυχή αναπαραγωγή της ασθένειας, οι μικροοργανισμοί τοποθετήθηκαν απευθείας στο γαλακτοφόρο κόλπο των προβάτων, οπότε μαστίτιδα αναπτύχθηκε σε 24 ώρες από τον ενοφθαλμισμό. Χαρακτηριστικά παθολογοανατομικά ευρήματα της ασθένειας είναι το υποδόριο οίδημα και εμφύσημα στο μαστικό αδένα, η εκροή αιμορραγικού υγρού από την επιφάνεια τομής, οι πολυεστιακές περιοχές αιμορραγίας στο παρέγχυμα, η παρουσία πυώδους συλλογής σε διάφορες περιοχές του παρεγχύματος, η παρουσία πηγμάτων μαστικού εκκρίματος και ινικής μέσα στους γαλακτοφόρους κόλπους και τέλος, η διόγκωση των επιχώριων λεμφογαγγλίων. Το βακτήριο καταστρέφει τα μαστικά επιθηλιακά κύτταρα (Vilela και συν. 2004).

Επιπλέον, τα ίδια κλινικά και παθολογοανατομικά ευρήματα καταγράφηκαν μετά από επαναλαμβανόμενες ενδομαστικές εγχύσεις λευκοτοξίνης του ίδιου στελέχους (Watkins 1990, Watkins & Jones 1992). Έτσι, αποδείχθηκε ο ρόλος της λευκοτοξίνης στην παθογένεια της ασθένειας.

Σε όλους τους πειραματικούς ενοφθαλμισμούς χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες 5 ωρών, δηλαδή στη λογαριθμική φάση ανάπτυξής τους, οπότε ήταν αναπτυγμένη και η βακτηριακή κάψα. Καθώς έχει βρεθεί (Gatewood, Fenwick & Chengappa 1994) ότι η κάψα αποτελεί σημαντικό λοιμογόνο παράγοντα των βακτηρίων, δεδομένου ότι προστατεύει από τη φαγοκυττάρωση, αποδεικνύεται έτσι και η σημασία των λευκοκυττάρων στο μαστικό αδένα των προβάτων ως μηχανισμού για την αντιμετώπιση της μόλυνσης από *M. haemolytica*.

Στελέχη *P. trehalosi* σπάνια έχουν απομονωθεί από περιπτώσεις μαστίτιδας.

Μυκοπλασματοειδή

Οι μικροοργανισμοί αυτοί είτε εισβάλλουν στο μαστικό αδένα από τη θηλή, είτε φτάνουν εκεί προερχόμενα από το αίμα (Kumar, Gupta, Rana & Banga 1993, Ayling, Bashiruddin, Nicholas 2004).

Η λοιμώδης αγαλαξία οφείλεται στο μικρόβιο *Mycoplasma agalactiae* (Bergonier, Blanc, Fleury, Lagriffoul, Barillet & Berthelot 1997, Madanat, Zendulkova & Pospischil 2001) και εκδηλώνεται με αποβολή ή γέννηση θνησιγενών εμβρύων, με οφθαλμικά συμπτώματα (κνησμώδης κερατοεπιπεφυκίτιδα, δακρύρροια, φωτοφοβία), με αρθρικά συμπτώματα (συχνότερα σε αντιβραχιοκαρπικές και ταρσοκνημικές αρθρώσεις) και με μαστικά συμπτώματα

(στον ένα ή και τους δύο μαστικούς αδένες) (Bergonier & Roumarat 1996). Αυτά συνήθως βρίσκονται στα ζώα ενός κοπαδιού και σπανιότερα, μπορούν επίσης να συνυπάρχουν σε ένα ζώο.

Η παραγόμενη ποσότητα γάλακτος ελαττώνεται, μέχρι την πλήρη στείρευση, και το έκκριμα γίνεται κίτρινο ή πράσινο, υφάλμυρο και ορώδες και περιέχει μικρά πήγματα (Bergonier & Roumarat 1996). Παρατηρείται επίσης διόγκωση των επιχώριων λεμφογαγγλίων. Η θνησιμότητα φτάνει συνήθως το 5 έως 10 και σπάνια το 25%. Η θεραπεία με διάφορα αντιβιοτικά μπορεί να οδηγήσει σε κλινική ίαση, αλλά σπάνια οδηγεί σε βακτηριολογική "εξυγίανση" (Bergonier και συν. 1997). Γι' αυτό το λόγο απαιτείται ιδιαίτερη φροντίδα, όταν σε κοπάδια χωρίς κλινικά συμπτώματα απομονωθεί το βακτήριο από το γάλα στο γαλακτοδοχείο (Sanchis, Abadie, Lambert, Cabasse, Dufour, Guibert & Pepin 2000).

Άλλα μυκοπλασματοειδή, τα οποία προκαλούν μαστίτιδα είναι (αλφαβητικά): *Acholeplasma oculi*, *M. bovigenitalium*, *M. bovis*, *M. californicum*, *M. canadense*, *M. capricolum* subsp. *capricolum* και *M. mycoides* subsp. *capri* (Jones 1983, Jones GE 1985, Ball & Mackie 1986, Ball 1990, Bocklisch, Kreusel, Brys & Pftzner 1991, Kumar και συν. 1993, Ayling και συν. 2004)

Clostridium perfringens

Το βακτήριο *Cl. perfringens* σπάνια είναι αιτιολογικός παράγοντας μαστίτιδας (Pegreff 1963, El-Masannat 1987). Μολοταύτα, το βακτήριο απομονώνεται συχνά από περιστατικά μαστίτιδας (ιδίως σε περιπτώσεις νέκρωσης του μαστικού ιστού), μάλλον ως αποτέλεσμα επιμόλυνσης του μαστικού αδένος από αυτό. Έτσι, έχει θεωρηθεί λανθασμένα ως αιτιολογικός παράγοντας της ασθένειας, ιδιαίτερα δε της "γαγγραινώδους" μορφής της (Mura & Altieri 1950, Katitch, Youkitchevitch, Jovanovitch & Militch 1968, Αδαμίδης 1980).

ΣΤΡΕΠΤΟΚΟΚΚΟΙ

Αναφέρονται περιπτώσεις μαστίτιδας προβάτων, που είχαν προκληθεί από *Streptococcus agalactiae*, από *Strep. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, από *Strep. equi* subsp. *zooepidemicus*, από *Strep. equi* subsp. *ruminantium* (Las Heras, Vela, Fernandez, Legaz, Domínguez & Fernandez-Garayzabal 2001, Fernandez, Blume, Garrido, Collins, Mateos, Dominguez & Fernandez-Garayzabal 2004), από *Strep. parasanguinis*, από *Strep. parauberis*, από *Strep. suis* ή από *Strep. uberis* (Fernandez-Garayzabal, Fernandez, Las Heras, Pascual, Collins & Dominguez

1998, Gabler, Reneau & Farnsworth 2001). Αυτά τα περιστατικά παρατηρήθηκαν σε εκτροφές όπου εφαρμόζονταν μηχανική άρμεξη. Γενικά, πάντως, οι στρεπτόκοκκοι δεν θεωρούνται συχνά και σημαντικοί αιτιολογικοί παράγοντες της ασθένειας (Lafi & Hailat 1998, Menzies 2000, Menzie & Ramanoon 2001, Bergonier & Berthelot 2003).

Εντεροβακτήρια

Αναφέρονται περιπτώσεις μαστίτιδας από *Escherichia coli* ή από *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, σε ενσταυλισμένα ζώα στην αμέσως μετά τον τοκετό τους περίοδο (Quinlivan 1968, Clark 1972, Mandal, Sharma & Ahuja 1977, Φθενάκης & Jones 1990, Al-Majali & Jawabreh 2003). Γενικότερα, το βακτήριο *E. coli* ενοχοποιείται ως αιτιολογικός παράγοντας της ασθένειας σε εκτροφές, όπου εφαρμόζεται σύστημα εντατικής εκμετάλλευσης (Albenzio, Taibi, Muscio & Sevi 2002).

Arcanobacterium pyogenes

Το βακτήριο *A. pyogenes* θεωρείται ως ο πιο συχνός αιτιολογικός παράγοντας μαστίτιδας κατά την ξηρή περίοδο (Weitz & Langridge 1947, Simmons & Ryley 1954, Ophanou 1987, Jones 1990, Saratsis και συν. 1998).

Άλλα βακτήρια

Αναφέρονται περιπτώσεις μαστίτιδας από τα βακτήρια (αλφαβητικά): *Actinobacillus lignieresii*, *A. seminis*, *Bacillus cereus*, *Brucella melitensis*, *Burkholderia cepacia*, *Corynebacterium camporealensis*, *C. mastitidis*, *C. pseudotuberculosis*, *Histophilus somni*, *L. monocytogenes*, *Micrococcus* spp., *Nocardia asteroides*, *Pseudomonas aeruginosa* και *Serratia macrescens* subsp. *macrescens* (Roberts 1956, Laws & Elder 1969, El-Etreby & Abdel-Hamid 1970, Quinlivan 1972, Jones & Turnbull 1981, Alsenosy & Dennis 1985, El-Masannat 1987, Honhold & Carter 1987, Maisi, Seppanen & Junttila 1987, Fernandez-Garayzabal, Collins, Hutson, Fernandez, Monasterio, Marco & Dominguez 1997, Fernandez-Garayzabal, Collins, Hutson, Gonzalez, Fernandez & Dominguez 1998, Fthenakis και συν. 1998, Tzora & Fthenakis 1998, Las Heras, Dominguez, Lopez & Fernandez-Garayzabal 1999, Rapoport, Visinsky, Hanoch, Faingolg, Shani, Hatib & Kussak 1999, Las Heras, Dominguez, Lopez, Paya, Pena,

Mazzucchelli, Garcia & Fernandez-Garayzabal 2000, Berriatua, Ziluga, Miguel Virto, Uribarren, Juste, Laevens, Vandamme & Govan 2001, Schoder και συν. 2003).

Chlamydophila abortus

Αναφέρεται περίπτωση μαστίτιδας από *Cp. abortus* (Papadopoulos & Leontides 1972).

Μύκητες

Αναφέρονται περιπτώσεις μαστίτιδας από *Aspergillus fumigatus* ως επακόλουθο ενδομαστικής χορήγησης αντιβιοτικών πριν τον τοκετό (Perez, Corpa, Marin, Aduriz & Jensen 1998, Garcia, Duran, Cruzado, Andrino & Blanco 2004), καθώς και *Candida krusei* (El-Bahri, Osman, Chadli & Franke 1969).

Ιοί

Σε κλινικές μελέτες της προϊούσας πνευμονίας των προβάτων (αιτιολογικός παράγοντας *lentivirus* της οικογένειας *Retroviridae*), βρέθηκε ότι σε μολυσμένα κοπάδια, το ποσοστό μαστικών ανωμαλιών ήταν αυξημένο (Bulgin, Adams & Ducloux 1985, Cutlip, Lehmkuhl, Brodgen & Bolin 1985, Van Der Molen, Vecht & Houwers 1985, Pekelder, Veenink, Akkermans, Van Eldik, Elving & Houwers 1994, Palfi & Glavits 1996, Pepin, Vitu, Russo, Mornex & Peterhans 1998, Dungu, Vosters & Bath, Verwoerd 2000, Hotzel & Cheevers 2001, 2002).

Από την πλειονότητα των συγγραφέων αναφέρεται ότι στα ζώα εμφανίζεται σκλήρυνση του μαστού, ο οποίος φαίνεται ότι είναι πλήρης με γάλα, αλλά παράγεται μόνο μικρή ποσότητα αυτών (Bulgin και συν. 1985). Η σκλήρυνση του μαστού και η μείωση της παραγωγής γάλακτος εμφανίζονται συχνά σε μολυσμένες από τον ιό εκτροφές (Van Der Molen και συν. 1985). Μολοταύτα, άλλοι ερευνητές ανέφεραν ότι οι μαστικοί αδένες εμφανίζονταν ατροφικοί (Κουκουλιού, Sofia, Deligiannis, Psychas, Lainas, Spyrou, Goulas & Billinis 2005). Η νόσος διαφέρει από τις βακτηριακές μολύνσεις στο ότι συνήθως οι δύο πάσχοντες μαστικοί αδένες του ασθενούς ζώου είναι ομοιόμορφοι σε μέγεθος και σύσταση, το έκκριμά τους φαίνεται φυσιολογικό και, συχνά, δε απομονώνονται μικροοργανισμοί στη βακτηριολογική εξέταση (Bulgin και συν. 1985). Σημειώνεται ότι σε περιπτώσεις μαστικής εκδήλωσης της νόσου η περιεκτικότητα του μαστικού εκκρίματος σε λίπος είναι ιδιαίτερα μειωμένη (Christodoulopoulos 2005).

Οι συνηθέστερες ιστολογικές αλλοιώσεις, οι οποίες φαίνονται διάχυτες και αμφοτερόπλευρες είναι εστιακή λεμφοειδής υπερπλασία γύρω από τους γαλακτοφόρους πόρους, διάμεση διήθη μονοπύρηνων κυττάρων και εκτεταμένη ίνωση (Cutlip και συν. 1985, Van Der Molen & Houwe 1987, Houwers, Pekelder, Akkermans, Van Der Molen & Schreuder 1988, Lujan, Marin, De Luc Vargas & Badiola 1991).

Προδιαθέτοντες παράγοντες

Οι παρακάτω αναφερόμενοι παράγοντες θεωρούνται οι συνηθέστεροι προδιαθέτοντες παράγοντες της μαστίτιδας των προβάτων. Αυτοί προσδιορίστηκαν σε κλινικές και επιδημιολογικές μελέτες, όμως δεν έχει καθοριστεί η ακριβής συμβολή ή το ποσοστό συμμετοχής καθενός στην εκδήλωση της ασθένειας.

Περιβαλλοντολογικοί παράγοντες

Διάφορα έντομα, ιδιαίτερα δε η μύγα *Hydrotoea irritans*, ίσως μεταδίδουν παθογόνα βακτήρια λόγω του διαδοχικού παρασιτισμού τους σε θηλές ασθενών και υγιών προβάτων (Jensen & Swift 1982, Jones 1990). Η επιμόλυνση των θηλών ενσταυλισμένων ζώων με κόπρανά ίσως προδιαθέτει σε μόλυνση μαστικών αδένων με εντεροβακτήρια. Η επίδραση των απότομων αλλαγών των κλιματολογικών συνθηκών στην εμφάνιση της ασθένειας είναι αδιευκρίνιστη, αν και αναφέρεται ότι η μαστίτιδα παρουσιάζεται συχνότερα μετά από έντονους κρύους ανέμους (Clark 1972).

Γενετικοί παράγοντες

Σε μελέτες των γενετικών παραγόντων που επηρεάζουν την ανθεκτικότητα των ζώων σε μαστίτιδα έχει βρεθεί ότι η κληρονομησιμότητα της ανθεκτικότητας στην ασθένεια είναι πολύ μικρή ($h_2=0,05$), κάνοντας έτσι την επιλογή ζώων ανθεκτικών σε αυτήν σχεδόν αδύνατη (Barillet και συν. 2001, Moroni & Cuccuru 2001, Serrano, Perez-Guzman, Montoro & Jurado 2003). Ίσως, όμως, υπάρχουν κάποιες φυλές προβάτων πιο ανθεκτικές στη μαστίτιδα από άλλες, όπως για παράδειγμα οι φυλές Merinos, Booroola-Merinos, Finnish-Landrace και Rambouillet (Watson, Franklin, Davies, Kettlewell & Frost 1990).

Επιπλέον, και η κληρονομησιμότητα του αριθμού των σωματικών κυττάρων στο μαστικό έκκριμα (ο οποίος πιθανόν αποτελεί έναν καλό δείκτη της ανθεκτικότητας των ζώων στη μαστίτιδα) είναι μικρή ($h_2=0,04-0,17$, ανάλογα με τη φυλή) (Baro, Carriedo & San Primitivo 1994, El-Saied, Carriero & San Primitivo 1998, Barillet και συν. 2001, Horstick, Hamann & Distl 2002, Ligda, Mavrogenis & Georgoudis 2002). Στις φυλές Churra και Lacaune φαίνεται ότι υπάρχει η μεγαλύτερη κληρονομησιμότητα ($h_2=0,11-0,15$) (Barillet και συν. 2001).

Μορφολογικοί παράγοντες

Η είσοδος των βακτηρίων στο μαστικό αδένα γίνεται από τη θηλή, άρα παράγοντες, όπως το μήκος του θηλαίου πόρου ή η διάμετρος του στομίου της θηλής, ίσως επηρεάζουν την είσοδο βακτηρίων στη θηλή. Έτσι, έχει βρεθεί ότι η διάμετρος του θηλαίου πόρου ευπρόσβλητων μαστικών αδένων ήταν μεγαλύτερη από εκείνη ανθεκτικών μαστικών αδένων (Plommet 1960, Franz, Hofmann-Parisot, Gutler, Baumgartner 2003). Αντίθετα, το μήκος του θηλαίου πόρου μάλλον δεν παίζει κάποιο ρόλο (Plommet 1960).

Η υπερπλήρωση του μαστικού αδένα με γάλα, το οποίο τρέχει από τη θηλή, μπορεί να προδιαθέσει σε μαστίτιδα, επειδή η ανοικτή θηλή αποτελεί πύλη εισόδου βακτηρίων. Συνεπώς, οι υπερμεγέθεις ή οι υπεράριθμες θηλές, των οποίων ο θηλασμός είναι δύσκολος και στις οποίες παραμένει μεγάλη ποσότητα γάλακτος, προδιαθέτουν σε μαστίτιδα (Menzies & Ramanoo 2001).

Ζωοτεχνικοί παράγοντες

Συνθήκες σταυλισμού

Η βόσκηση σε λασπώδη εδάφη έχει συσχετιστεί με μαστίτιδα λόγω της μόλυνσης των μαστικών αδένων από το έδαφος. Επίσης, η εκτροφή σε προβατοστάσια συσχετίστηκε με μαστίτιδα οφειλόμενη σε *E. coli* (Quinlivan 1968, Clark 1972, Albenzio και συν. 2002). Σε αυτές τις εκτροφές, τα κρούσματα μαστίτιδας από Σταφυλοκόκκους είναι πιο σπάνια, μάλλον, επειδή η μετάδοσή τους είναι πιο δύσκολη λόγω των καλύτερων συνθηκών υγιεινής που εφαρμόζονται (Albenzio και συν. 2002).

Ο ενσταυλισμός των ζώων σε μικρούς σταύλους, στους οποίους τα ζώα δεν έχουν δυνατότητα πολλών κινήσεων, προδιαθέτει σε μαστίτιδα. Συγκεκριμένα, θεωρείται ότι απαιτούνται 7 m² ανά ζώο για άριστη απόδοση και πρόληψη της μαστίτιδας σε γαλακτοπαραγωγές

προβατίνες (Sevi, Massa, Annicchiarico, Dell'Aquila & Muscio 1999, Sevi, Taibi, Albenzio, Muscio & Annicchiarico 2000, Sevi, Taibi, Albenzio, Annicchiarico & Muscio 2001).

Επίσης, φαίνεται ότι έχει σημασία και η διαχείριση των αποβλήτων στην εκτροφή, καθώς έχει αναφερθεί ότι αυτά επηρεάζουν την ποιότητα του αέρα στα κτίρια και, συνακόλουθα, το ύψος της γαλακτοπαραγωγής, την ποιότητα του γάλακτος και την εκδήλωση μαστίτιδας (Sevi, Albenzio, Muscio, Casamassima & Centoducati 2003).

Διαδικασία άρμεξης

Το ποσοστό προσβολής από μαστίτιδα έχει συσχετισθεί με τη διαδικασία άρμεξης των ζώων σε κάθε εκτροφή, καθώς και με τη ρύθμιση των αρμεκτικών μηχανών. Ο Marco Melegro (1994) ανέφερε μεγαλύτερο ποσοστό προσβολής σε εκτροφές, όπου τα ζώα αρμέγονταν με τα χέρια (32%), σε σχέση με εκτροφές, όπου αρμέγονταν με αρμεκτική μηχανή (29%).

Οι λανθασμένα ρυθμισμένες (ως προς την πίεση και τη συχνότητα παλμών) αρμεκτικές μηχανές προδιαθέτουν σε μαστίτιδα (Bushnell, Brazil & Jasper 1978, Ruffo & Sangiorgio 1978). Οι συνέπειες αυτές είναι πιο συχνές στο τέλος της γαλακτικής περιόδου, όπου καθώς η παραγόμενη ποσότητα γάλακτος μειώνεται χωρίς να ρυθμίζεται ανάλογα η αρμεκτική μηχανή, η καταπόνηση του μαστικού αδένου είναι πιο έντονη (Sevi, Albenzio, Marino, Santillo & Muscio 2004).

Η αύξηση της συχνότητας άρμεξης από δύο σε τρεις φορές καθημερινά πιθανόν προδιαθέτει σε μαστίτιδα, επειδή ο μαστικός αδένος καταπονείται από τη συχνή άρμεξη (Olechpowicz & Jaskowski 2003). Επιπλέον, δεδομένου ότι μετά την άρμεξη η θηλή των ζώων παραμένει ανοικτή επί περίπου 30 min., χρονικό διάστημα κατά το οποίο ο μαστικός αδένος παραμένει ευάλωτος στην εισβολή βακτηρίων από το περιβάλλον (Williams and Mein 1987, Φθενάκης 1993), η συχνή άρμεξη πιθανόν προδιαθέτει σε συχνή μόλυνση της θηλής και του μαστικού παρεγχύματος. Έτσι, η συνήθεια των ζώων να κατακλίνονται αμέσως μετά την άρμεξη, πιθανόν προδιαθέτει σε μαστίτιδα, επειδή η ανοικτή (λόγω της άρμεξης) θηλή έρχεται σε άμεση επαφή με το έδαφος και συνεπώς είναι εύκολη η μόλυνση του μαστικού αδένου (Williams and Mein 1987, Φθενάκης 1993). Όμως, η αύξηση της συχνότητας άρμεξης πιθανόν και να προστατεύει από τη μαστίτιδα, επειδή έτσι αποβάλλονται από το μαστικό αδένου τα βακτήρια, που είχαν εισβάλει σε αυτόν (Williams & Mein 1985).

Η σταγόνα του μαστικού εκκρίματος, που παραμένει στο έξω στόμιο της θηλής μετά το τέλος της άρμεξης, λειτουργεί ως υπόστρωμα για την εγκατάσταση και τον πολλαπλασιασμό βακτηρίων, που αργότερα εισβάλλουν στο μαστικό αδένου και προκαλούν μαστίτιδα. Έτσι, η παράλειψη της απολύμανσης των θηλών μετά την άρμεξη, πιθανόν, προδιαθέτει σε μαστίτιδα.

Όμοια πιθανόν προδιαθέτει σε μαστίτιδα και η παράλειψη της απολύμανσης ή η ελλιπής απολύμανση των χεριών των αρμεκτών ή των αρμεκτικών συστημάτων (Bergonier & Berthelot 2003).

Αριθμός της γαλακτικής περιόδου

Η αύξηση του ποσοστού προσβολής από την ασθένεια έχει συσχετιστεί με την πάροδο της ηλικίας και τον αριθμό της γαλακτικής περιόδου (Kirk και συν. 1980, Watson και συν. 1990, Watkins και συν. 1991, Ahmad και συν. 1992, Fthenakis 1994, Sevi και συν. 2000, Leitner, Chaffer, Zamir, Mor, Glickman, Winkler, Weisblit & Saran 2001).

Στάδιο της γαλακτικής περιόδου

Η συχνότητα της κλινικής μαστίτιδας ποικίλλει ανάλογα με το στάδιο της γαλακτικής περιόδου. Η περιτοκίαία αύξηση της συχνότητας της κλινικής μαστίτιδας που παρατηρείται στις αγελάδες, δεν είναι συχνή στις προβατίνες (Bergonier & Berthelot 2003). Όμως αυτά τα περιστατικά οφείλονται συνήθως σε *E. coli*.

Στις προβατίνες γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης, παρατηρείται αυξημένη συχνότητα στην περίοδο που αρχίζει η άρμεξη των ζώων, ιδιαίτερα δε όταν γίνεται μηχανική άρμεξη. Σε αυτήν την περίπτωση, οι μολύνσεις οφείλονται κυρίως σε *S. aureus* (Φθενάκης & Jones 1990, Bergonier & Berthelot 2003).

Η περίοδος κατά την έναρξη της ξηράς περιόδου θεωρείται κρίσιμη για την εγκατάσταση νέων μολύνσεων. Η εισαγωγή του ρύγχους της ενδομαστικής σύριγγας (κατά την προληπτική φαρμακευτική αγωγή ξηράς περιόδου) στη θηλή μπορεί να προκαλέσει τραυματισμό της θηλής και να συμπαρασύρει μικροοργανισμούς προς το μαστικό παρέγχυμα (Bergonier & Berthelot 2003). Επίσης, παρατηρούνται περιστατικά συγκεκριμένης αιτιολογίας (μαστίτιδα που οφείλεται σε *B. cereacia*, *Ps. aeruginosa* ή μύκητες) κατά την περίοδο αυτή και/ή αμέσως μετά τον τοκετό, λόγω της κακής εφαρμογής της ενδομαστικής σύριγγας (Bergonier, Berthelot & Roumarat 1997, Las Heras και συν. 2000, Leitner και συν. 2001).

Ποσότητα γαλακτοπαραγωγής

Οι Dankow, Wojtowski και Matylla (1998) ανέφεραν ότι σε προβατοτροφικές εκμεταλλεύσεις με ζώα μεγάλης γαλακτοπαραγωγής παρουσιαζόταν μεγαλύτερο ποσοστό προσβολής (έως 48%) από υποκλινική μαστίτιδα, ενώ αντίθετα σε προβατοτροφικές εκμεταλλεύσεις με ζώα μέσης ή μεγάλης γαλακτοπαραγωγής το ποσοστό προσβολής ήταν μικρότερο (έως 22%).

Ηθολογικοί παράγοντες

Ο θηλασμός από κάθε αμνό περισσότερων της μιας προβάτων θεωρείται ότι προδιαθέτει σε μετάδοση παθογόνων βακτηρίων από το μαστικό αδένά ενός θηλυκού ζώου σε αυτόν κάποιου άλλου (Jensen & Swift 1982). Επιπλέον, ο θηλασμός του ίδιου θηλυκού ζώου από δύο ή τρεις αμνούς πιθανόν προδιαθέτει σε μαστίτιδα, λόγω των προκαλούμενων τραυμάτων στις θηλές (Jones 1990). Επίσης, πιθανόν προδιαθέτει το μέγεθος των αμνών που θηλάζουν. Μάλιστα, αναφέρθηκε ότι μεγάλωσομοι αμνοί θήλαζαν τις μητέρες τους με πιο "βίαιο" τρόπο, οδηγώντας σε τραυματισμό της θηλής και πιθανόν προδιαθέτοντας σε μαστίτιδα (Marsh 1932, Tunnicliff 1949).

Διατροφικοί παράγοντες

Αναφέρεται ότι προβατίνες οι οποίες βόσκουν σε λιβάδια τριφυλλιού με μεγάλη συγκέντρωση οιστρογόνων είναι ευπαθείς σε μαστίτιδα, καθώς και ότι η κατανάλωση μουχλιασμένων ζωοτροφών πιθανόν προδιαθέτει σε μαστίτιδα (Φθενάκης 1993).

Καθώς ο ψευδάργυρος παίζει ρόλο στην ακεραιότητα και τη λειτουργία των κεράτινων σχηματισμών του σώματος, πιθανόν η ψευδαργυροπενία προδιαθέτει σε μαστίτιδα. Σ' αυτήν την περίπτωση, δεδομένου ότι η κεράτινη ουσία της θηλής δεν είναι ακέραια και έτσι δεν προστατεύεται επαρκώς ο μαστικός αδένας, τα βακτήρια εισβάλλουν πιο εύκολα (Caruso, Bright, Pankey, Wood, Miller & Bitman 1992).

Αναφέρεται ότι η σεληνιοπενία και η έλλειψη βιταμίνης Ε πιθανόν προδιαθέτουν σε μαστίτιδα. Σε αυτήν την περίπτωση, καθώς δεν προλαμβάνεται η οξειδωτική καταστροφή των λιπαρών οξέων των κυτταρικών μεμβρανών, επιβραδύνεται η λευκοκυτταρική αντίδραση μετά τη μόλυνση του μαστικού αδένά (McDowell, Williams, Hidiroglou, Njeru, Hill, Ochoa & Wilkinson 1996, Ronchi, Lacetera, Bernabucci & Nardone 1996). Μάλιστα, σε κλινικές μελέτες βρέθηκε ότι η χορήγηση σεληνίου και βιταμίνης Ε συσχετίστηκε με μείωση του ποσοστού προσβολής, της κλινικής βαρύτητας και της διάρκειας των ενδομαστικών μολύνσεων (Ronchi και συν. 1996, Morgante, Bechelli, Pauselii, Dall' Ara, Capucella & Ranucci 1999).

Η χορήγηση σιτηρεσίων, που αποτελούνται σε μεγάλο ποσοστό από σταυρανθή ή ψυχανθή φυτά, ίσως προστατεύει από τη μαστίτιδα, επειδή αυξάνεται η περιεκτικότητα του μαστικού εκκρίματος σε θειοκυανικά οξέα, με αποτέλεσμα τη βελτίωση της δράσης του

συστήματος γαλακτοπεροξειδάσης / θειοκυανικών οξέων / υπεροξειδίου του υδρογόνου στο μαστικό αδέννα (Φθενάκης 1993).

Τέλος, η μεγάλη περιεκτικότητα του σιτηρεσίου σε βαμβακόπιτα και, συνακόλουθα, η πρόσληψη μεγάλης ποσότητας γοσσυπόλης, αναφέρεται ότι κατέληξε σε μεγάλο ποσοστό προσβολής από υποκλινική μαστίτιδα (Fthenakis, Leontides, Skoufos, Taitzoglou & Tzora 2004).

Νοσολογικοί παράγοντες

Στις αγελάδες έχει αποδειχθεί η συσχέτιση μεταξύ των τραυμάτων των θηλών με τη μαστίτιδα (Saloniemi & Roine 1981, Witzig, Rusch & Berchtold 1984, Neijenhuis, Barkema, Hogeveen & Noordhuizen 2001), ακόμα και όταν οι αλλοιώσεις ήταν μικρής έκτασης (Agger & Willeberg 1986). Γενικά, οι αλλοιώσεις στο δέρμα των θηλών (π.χ. τραυματισμοί ή σκασίματα [αλλοιώσεις τύπου "chapping"]) έχουν συσχετιστεί με μεγάλο ποσοστό αποικιοποίησής του από *S. aureus* (Fox & Cumming 1995).

Στις προβατίνες η ανάλογη βιβλιογραφία δεν είναι σαφής. Κάποιοι συγγραφείς αναφέρουν συσχέτιση μεταξύ μαστίτιδας και αλλοιώσεων των θηλών (Doherty & Bassett 1989, Gunning & Bosworth 1989, Quinney, Davison & Bebbington 2003, Onash, Healy, Brophy, Kinsella & Doherty 2003). Επιπλέον, οι Watt (1983) και Reid (1991) ανέφεραν ότι το λοιμώδες έκθυμα συνήθως είχε ως επιπλοκή τη μαστίτιδα. Αντίθετα, άλλοι συγγραφείς (Watkins και συν. 1991, Al-Majali & Jawabreh 2003) δεν βρήκαν συσχέτιση μεταξύ μαστίτιδας και αλλοιώσεων στις θηλές. Σημειώνεται ότι δεν υπάρχουν ερευνητικά δεδομένα γι' αυτήν την υπόθεση.

Παθογένεια

Στην πλειονότητα των περιπτώσεων η ασθένεια παρουσιάζεται σποραδικά στα ζώα κάποιας εκτροφής, όμως περιπτώσεις επιζωοτίας έχουν επίσης αναφερθεί. Η ασθένεια εξελίσσεται στις παρακάτω τέσσερις φάσεις.

- i. Έκθεση της θηλής σε κάποιο παθογόνο μικροοργανισμό.
- ii. Είσοδος του μικροοργανισμού στη θηλή.
- iii. Επιβίωση και πολλαπλασιασμός του μικροοργανισμού στη θηλή και εισβολή στο μαστικό αδέννα.

iv. Παραγωγή των λοιμογόνων παραγόντων (π.χ. τοξινών) από το μικρόβιο, αλληλεπίδρασή του με τα λευκοκύτταρα και πρόκληση φλεγμονώδους αντίδρασης.

Στην πλειονότητα των περιπτώσεων η μαστίτιδα αρχίζει ως αποτέλεσμα εισόδου βακτηρίων στη θηλή. Η πορεία της ασθένειας μετά την είσοδο των βακτηρίων στη θηλή εξαρτάται από την αμυντική ικανότητα του ζώου και τους λοιμογόνους παράγοντες κάθε μολύνοντος στελέχους. Η πρώτη συνάντηση και αλληλεπίδραση των εισβαλλόντων βακτηρίων με τα αμυντικά κύτταρα του ζώου λαμβάνει χώρα στη θηλή.

Ο πιο σημαντικός αμυντικός παράγοντας του μαστικού αδένου είναι τα λευκοκύτταρα. Στην αντιμετώπιση της μόλυνσης παίζουν μικρότερο ρόλο και οι χυμικοί αμυντικοί μηχανισμοί: οι κυτοκίνες, οι ανοσοσφαιρίνες, το συμπλήρωμα, η γαλακτοσιδηρίνη, το σύστημα γαλακτοπεροξειδάσης / θειοκυανικών ιόντων / υπεροξειδίου του υδρογόνου και η λυσοζύμη.

Μετά από πειραματικές μελέτες αποδείχθηκε ότι η βαρύτητα της μαστίτιδας δεν συσχετιζόταν τόσο με τη μολύνουσα δόση κάθε βακτηρίου, όσο με το ενοφθαλμιζόμενο στέλεχος (δηλαδή με τους λοιμογόνους παράγοντες κάθε στελέχους) και με το πειραματόζωο (δηλαδή με τους αμυντικούς μηχανισμούς του ξενιστή) (El-Masannat 1987, Fthenakis 1988, Watkins 1990). Τα χαρακτηριστικά της αρχικής φάσης της μόλυνσης, δηλαδή οι αλληλεπιδράσεις μικροοργανισμών - ζώου μέσα στη θηλή, δεν είναι γνωστά.

Αφού υπερκεράσουν τους αμυντικούς μηχανισμούς της θηλής και εισβάλλουν στο μαστικό αδένου, τα βακτήρια πολλαπλασιάζονται και αρχίζουν την παραγωγή παραγόντων, οι οποίοι προκαλούν κυρίως αύξηση της διαπερατότητας των αγγειακών τοιχωμάτων. Επίσης, παρατηρείται αύξηση του αριθμού των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων και οίδημα στο μαστικό αδένου. Επιπλέον, υπάρχει μεγάλος αριθμός βακτηρίων στους γαλακτοφόρους πόρους, στις εκκριτικές αδενοκυψελίδες και μέσα στα μαστικά επιθηλιακά κύτταρα.

Στη συνέχεια, παρουσιάζονται υπεραιμία και αιμορραγία. Αρχικά, αυτές εντοπίζονται στο μεσοκυψελιδικό χώρο και αργότερα στις εκκριτικές αδενοκυψελίδες. Εάν η καταστροφή των αγγειακών τοιχωμάτων είναι μεγάλη και η αιμορραγία εκτεταμένη, τότε παρουσιάζεται αιματηρό ή οροαιματηρό μαστικό έκκριμα.

Επιπλέον, τα προϊόντα μεταβολισμού των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων στο μαστικό ιστό ασκούν περαιτέρω φλεγμονώδη δράση. Παρατηρούνται, επίσης, λύση ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων και καταστροφή μαστικών επιθηλιακών κυττάρων και εκκριτικών αδενοκυψελίδων (Fthenakis 1988). Η εκτεταμένη καταστροφή των στοιχείων του μαστικού παρεγχύματος είναι η αιτία για την παρατηρούμενη στην υποκλινική μαστίτιδα μείωση της γαλακτοπαραγωγής (Fthenakis & Jones 1990β).

Στην οξεία αιμορραγική μορφή της ασθένειας παρατηρείται νέκρωση, η οποία συνήθως αρχίζει από την περιοχή γύρω από το γαλακτοφόρο κόλπο, αλλά μπορεί να εξαπλωθεί σε όλο το μαστικό αδένα. Από το νεκρωμένο μαστικό ιστό αρχίζει η έξοδος ορού. Ο νεκρωμένος ιστός διαχωρίζεται από τον υγιή και αργότερα αποπίπτει (El-Masannat 1987). Οι αλλοιώσεις είναι του τύπου της υγρής γάγγραινας με χαρακτηριστικά μεγάλη παραγωγή υγρού (Jubb, Kennedy & Palmer 1985, El-Masannat 1987). Το τμήμα του μαστικού ιστού που νεκρώνεται διαφέρει σε κάθε περίπτωση και είναι δυνατόν νεκρωμένα λόβια να βρίσκονται δίπλα σε υγιή. Οι γαγγραινώδεις αλλοιώσεις οφείλονται σε ιστοτοξική δράση των βακτηριακών τοξινών στο μαστικό ιστό και σε φλεβική θρόμβωση. Η απόπτωση κάποιου τμήματος μαστικού ιστού ακολουθείται από επούλωση, η οποία γίνεται με ουλοποίηση, και από παλινδρόμηση του μαστικού αδένα (Jubb και συν. 1985, Watkins 1990).

Σε λιγότερο βαριές μορφές της ασθένειας, η αρχική οξεία εξιδρωματική αντίδραση ακολουθείται από δύο φαινόμενα, τα οποία συμβαίνουν ταυτόχρονα: ίνωση και παλινδρόμηση του μαστικού αδένα (Fthenakis 1988, Fthenakis & Jones 1990β, Jubb και συν. 1985). Η ουδετεροφιλική διήθηση συνεχίζεται, αλλά βρίσκονται επίσης λεμφοκύτταρα και ινοβλάστες χαρακτηριστικοί της χρόνιας φλεγμονής, των οποίων ο αριθμός αυξάνεται προοδευτικά. Στο διάμεσο ιστό εμφανίζονται πυρήνες λεμφοκυτταρογένεσης και, αργότερα, ο μαστικός αδένας κατακλύζεται από λεμφοκύτταρα (Fthenakis 1988, Fthenakis & Jones 1990β). Μερικές αδενοκυψελίδες διογκώνονται και περιλαμβάνουν πύγματα ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων, βακτηρίων και νεκρών κυτταρικών στοιχείων. Το εύρημα αυτό είναι χαρακτηριστικό της παλινδρόμησης του μαστικού αδένα (Fthenakis 1988, Jubb και συν. 1985). Η παλινδρόμηση του μαστικού αδένα ίσως αποτελεί κάποιου είδους αμυντικό μηχανισμό (Jubb και συν. 1985), καθώς με την παύση της γαλακτοπαραγωγής το ζώο έχει μεγαλύτερη διαθέσιμη ποσότητα ενέργειας για την παραγωγή και την κινητοποίηση φαγοκυττάρων και τη φαγοκυττάρωση.

Επειδή η ίνωση συμβαίνει χαρακτηριστικά γύρω από τις εκκριτικές αδενοκυψελίδες και τους μικρού μεγέθους γαλακτοφόρους πόρους (Fthenakis & Jones 1990), ίσως επηρεάζει την αποτελεσματική έκθλιψή τους και την έξοδο του εκκρίματος σε επόμενες γαλακτικές περιόδους. Στο τέλος της εξεργασίας, μερικά λόβια παρουσιάζονται με πλήρη παλινδρόμηση, μερικά με πλήρη περικύκλωση από ινώδη ιστό και μερικά με ίση αναλογία μεταξύ των δύο καταστάσεων. Στο μεγαλύτερο μέρος του μαστικού αδένα υπάρχει ινώδης ιστός (Fthenakis 1988) και τα βακτήρια παραμένουν στους τελικούς γαλακτοφόρους πόρους, όπου εγκυστώνονται (σχηματισμός αποστημάτων με παχύ στρώμα συνδετικού ιστού), είτε επαναδραστηριοποιούνται σε οξεία φλεγμονή (αναζωπυρούμενη μαστίπδα). Είναι πιθανόν σε κάποιο μαστικό αδένα να υπάρχουν πολλά λόβια σε διάφορες φάσεις του παραπάνω κύκλου.

Διάγνωση

Κλινικά ευρήματα

Η διάγνωση της κλινικής μαστίτιδας βασίζεται στην κλινική εξέταση της προβατίνας. Αρχικά, ελέγχεται η γενική κατάστασή της και καταγράφεται η θερμοκρασία της. Για την εξέταση των μαστικών αδένων, το ζώο φέρεται σε τέτοια θέση, ώστε η περινεϊκή χώρα του ακουμπά στο δάπεδο και η ράχη του στηρίζεται στα πόδια ενός βοηθού. Οι δύο μαστικοί αδένες παρατηρούνται, ψηλαφούνται και συγκρίνονται ο ένας με τον άλλο. Το σχήμα τους, το μέγεθός τους, η θερμοκρασία τους και οποιοσδήποτε ανωμαλίες τους καταγράφονται. Επίσης πρέπει να ψηλαφώνται και τα επιχώρια (μαστικά) λεμφογάγγλια.

Στη συνέχεια, εξετάζεται το μαστικό έκκριμα. Μία μικρή ποσότητα εκκρίματος συλλέγεται πάνω στην παλάμη του δειγματολήπτη, ο οποίος φορώντας γάντια, εξετάζει την ύπαρξη παθολογικών χαρακτηριστικών. Ακολουθεί η λήψη δείγματος εκκρίματος σε στείρο φιαλίδιο για εργαστηριακή εξέτασή του.

Κατά την εξέταση των ζώων στο τέλος της γαλακτικής περιόδου, με ψηλάφηση των μαστικών αδένων, ανιχνεύονται χρόνια περιστατικά μαστίτιδας, τα οποία δεν είχαν εντοπιστεί κατά τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου (Watson & Buswell 1984, Kirk & Glenn 1996, Bergonier και συν. 1997, Orphanou 1997, Esnal, Gonzalo, Garcia, Escobal, Contreras & Marco 1999). Στα περιστατικά αυτά παρατηρούνται ασυμμετρία των δύο μαστικών αδένων μεταξύ τους, διάχυτη σκλήρυνση ενός μαστικού αδένου, ενδομαστικά αποστήματα, ογκίδια, οζίδια και κύστεις.

Βακτηριολογικά ευρήματα

Η σωστή μέθοδος συλλογής δειγμάτων μαστικού εκκρίματος βασίζεται στις αρχές της κατά το δυνατόν άσηπτης δειγματοληψίας. Έτσι, αρχικά πραγματοποιείται καθαρισμός της θηλής, απόρριψη των πρώτων ακτίνων εκκρίματος και στη συνέχεια, συλλογή του δείγματος σε στείρο φιαλίδιο (Sears, Gonzalez, Wilson & Han 1993). Τα δείγματα πρέπει να φυλάσσονται σε χαμηλή θερμοκρασία και να μεταφέρονται στο εργαστήριο όσο πιο γρήγορα γίνεται ή να καταψύχονται, εφόσον δεν προβλέπεται η άμεση καταμέτρηση των σωματικών κυττάρων. Σημειώνεται ότι πρέπει να δίνεται προσοχή στις συνθήκες διατήρησης των δειγμάτων πριν την επεξεργασία τους. Εάν τα δείγματα διατηρηθούν εκτός ψυγείου για μακρό χρονικό διάστημα, τα αποτελέσματα μπορεί να είναι λανθασμένα (Clements, Taylor & Fitzpatrick 2003).

Το πιο καλό υπόστρωμα καλλιέργειας μαστικού εκκρίματος είναι το αιματούχο άγαρ. Η χρήση τρυβλίων με άγαρ MacConkey, καθώς και η επώαση τρυβλίων σε αναερόβιο περιβάλλον δε θεωρούνται απαραίτητες (Jones JET 1985). Η χρήση υποστρωμάτων καλλιέργειας και απομόνωσης μυκοπλασματοειδών είναι χρήσιμη, όταν υπάρχει υπόνοια εμπλοκής τους στην αιτιολογία της ασθένειας (Σαρρής 1978, Ayling και συν. 2004).

Η διάγνωση της υποκλινικής μαστίτιδας πρέπει να βασίζεται στην ταυτόχρονη απομόνωση βακτηρίων από το μαστικό έκκριμα και στην ανίχνευση αλλαγών στην κυτταρική και στη χημική σύνθεση του μαστικού εκκρίματος, οι οποίες είναι αποδεικτικές της φλεγμονώδους αντίδρασης στο μαστικό αδένωμα.

Πάντως και η απομόνωση βακτηρίων από δείγματα μαστικού εκκρίματος δεν είναι αυτή καθαυτή πάντα αποδεικτική υποκλινικής μαστίτιδας. Οι πηκτάση-αρνητικοί Σταφυλόκοκκοι, οι οποίοι είναι οι πιο σημαντικοί αιτιολογικοί παράγοντες υποκλινικής μαστίτιδας, απομονώνονται από το δέρμα του μαστού και από υλικό από το θηλαίο πόρο υγιών προβάτων (Fthenakis 1988). Καθώς μπορούν να επιμολύνουν στείρα δείγματα μαστικού εκκρίματος, μπορεί να ερμηνευθούν λανθασμένα τα αποτελέσματα της βακτηριολογικής εξέτασής του. Συνιστάται η απομόνωση τουλάχιστον 10 αποικιών κάποιου βακτηρίου από το περιεχόμενο ενός μικροβιολογικού κρίκου, για να θεωρηθεί το μικρόβιο ως αιτιολογικός παράγοντας υποκλινικής μαστίτιδας. Επιπλέον, για την οριστική διάγνωση υποκλινικής μαστίτιδας είναι απαραίτητη η ταυτόχρονη ανίχνευση της αύξησης του αριθμού των λευκοκυττάρων στο μαστικό έκκριμα (Jones 1991).

Κυτταρολογικά ευρήματα

Αριθμός κυττάρων στο μαστικό έκκριμα

Θεωρητικά, το έκκριμα υγιών μαστικών αδένων περιέχει μόνο μαστικά επιθηλιακά κύτταρα. Στην πράξη όμως, τέτοιοι μαστικοί αδένες δε βρίσκονται και έτσι η ύπαρξη κάποιου αριθμού κυττάρων λευκοκυτταρικής προέλευσης ("σωματικά κύτταρα") στο μαστικό έκκριμα γίνεται αποδεκτή ως φυσιολογική (Schalm και συν. 1971, Mackie & Rodgers 1986). Σε περιπτώσεις μόλυνσης του μαστικού αδένου υπάρχει έντονη και χαρακτηριστική αύξηση του αριθμού των λευκοκυττάρων στο μαστικό έκκριμα και ο αριθμός των σωματικών κυττάρων αυξάνεται σε περισσότερα από $1,0 \times 10^6$ κύτταρα ανά ml μαστικού εκκρίματος (Fthenakis, El-Masannat, Booth & Jones 1991).

Ο αριθμός των σωματικών κυττάρων στο φυσιολογικό μαστικό έκκριμα υγιών προβάτων δεν έχει ακόμη προσδιοριστεί με ακρίβεια και έτσι προκύπτουν διαγνωστικά προβλήματα.

Διάφοροι ερευνητές έχουν προτείνει διάφορες τιμές ως το ανώτερο επιτρεπτό όριο της τιμής των σωματικών κυττάρων. Οι Bergonier και συν. (2003) ανασκόπησαν τη σχετική βιβλιογραφία και ανέφεραν ότι οι τιμές που έχουν προταθεί μετά από μέτρηση με τη φθοριο-οπτικο-ηλεκτρονική μέθοδο, κυμαίνονταν από $0,2 \times 10^6$ έως $1,5 \times 10^6$ κύτταρα ανά ml μαστικού εκκρίματος. Όμως, από την πλειονότητα των ερευνητών προτείνονται τιμές μικρότερες από $0,5 \times 10^6$ κύτταρα ανά ml μαστικού εκκρίματος (Mavrogenis, Koumas, Kakoyiannis & Taliotis 1995, Romeo, Esnal, Contreras, Aduriz, Gonzalez & Marco 1996, Pengov 2001, MacDougall & Voermans 2002).

Οι Romeo, Ziluga και Marco (1998) πρότειναν τη χρήση δύο τιμών για τη διάκριση των "υγιών" από τους "μολυσμένους" μαστικούς αδένες: $0,14 \times 10^6$ και $0,34 \times 10^6$ κύτταρα ανά ml εκκρίματός τους, αντίστοιχα. Επίσης, προτάθηκε η χρήση δύο τιμών για τη διάκριση των μολυσμένων από "μικρής σημασίας" μικροοργανισμούς από τους μολυσμένους από "μεγάλης σημασίας" μικροοργανισμούς μαστικούς αδένες: $0,244 \times 10^6$ και $1,0 \times 10^6$ κύτταρα ανά ml εκκρίματός τους, αντίστοιχα (Suarez, Busetti, Miranda, Calvino, Bedotti & Canavesio 2002).

Οι Berthelot, Lagriffoul, Concordet, Barillet και Bergonier (2005) παρουσίασαν δύο προσεγγίσεις για την πρακτική σημασία της καταμέτρησης των σωματικών κυττάρων στο μαστικό έκκριμα των προβάτων. Στην πρώτη προσέγγισή τους, πρότειναν ένα "στιγμιαίο" όριο, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιείται όταν είναι διαθέσιμα αποτελέσματα μίας μόνο μέτρησης. Με αυτό επιτρέπεται η κατ' αρχήν διάκριση των μαστικών αδένων σε "υγιείς" ή "ασθενείς".

Αρκετοί ερευνητές έχουν ανακοινώσει αποτελέσματα μελετών, χρησιμοποιώντας κυρίως τη φθοριο-οπτικο-ηλεκτρονική μέθοδο, και πρότειναν "στιγμιαίο" όριο. Οι τιμές που προτείνονται για το όριο αυτό κυμαίνονται από $0,2 \times 10^6$ έως $1,0 \times 10^6$ κύτταρα ανά ml μαστικού εκκρίματος, με βάση τις οποίες η ακρίβεια των μετρήσεων κυμαίνεται από 79% έως 88% (Beltran de Heredia & Iturritza 1988, Mavrogenis και συν. 1995, Fthenakis 1996, Romeo και συν. 1996, McDougall, Murdough, Pankey, Delaney, Barlow & Scruton 2001).

Με βάση τη δεύτερη προσέγγιση των Berthelot και συν. (2002) και των Berthelot και συν. (2005), γίνονται πολλές μετρήσεις κατά την διάρκεια της γαλακτικής περιόδου, με βάση τα αποτελέσματα των οποίων οι μαστικοί αδένες κατατάσσονται σε μία από τις παρακάτω τρεις κατηγορίες: "υγιείς", "ύποπτοι", "μολυσμένοι". Έτσι ένας μαστικός αδένας θεωρείται "υγιής", εάν σε κάθε μέτρηση εκτός από δύο, βρίσκονται λιγότερα από $0,5 \times 10^6$ κύτταρα ανά ml στο έκκριμά του, "μολυσμένος" εάν σε τουλάχιστον δύο μετρήσεις βρίσκονται περισσότερα από $1,0 \times 10^6$ κύτταρα ανά ml στο έκκριμά του και "ύποπτος" στις άλλες περιπτώσεις. Η ευαισθησία και η ειδικότητα αυτού του κανόνα ήταν >80% και, με βάση αυτόν, η ακριβής κατάσταση κάποιου μαστικού αδένος προσδιοριζόταν με ακρίβεια 75% (Bergonier, Lagriffoul, Barillet & Berthelot 1999).

Μέθοδοι καταμέτρησης των κυττάρων στο μαστικό έκκριμα

Ο αριθμός των σωματικών κυττάρων στο μαστικό έκκριμα προσδιορίζεται με άμεσους ή έμμεσους τρόπους.

Η καταμέτρηση του αριθμού των σωματικών κυττάρων στο μαστικό έκκριμα με μικροσκόπηση είναι μέθοδος αναφοράς, αξιόπιστη, αλλά επίπονη (International Dairy Federation 1984, Morgante, Ranucci, Pauselli, Beggelli & Mencaroni 1996) Παλαιότερα χρησιμοποιείτο ευρέως η μέθοδος καταμέτρησης με ηλεκτρονικό μετρητή σωματιδίων (Coulter-Counter). Σήμερα, χρησιμοποιείται κυρίως η φθοριο-οπτικο-ηλεκτρονική μέθοδος με ηλεκτρονικό μετρητή σωματιδίων, η οποία είναι χρήσιμη, αξιόπιστη και εύκολα πραγματοποιήσιμη (Gonzalo, Baro, Carriedo & San Primitivo 1993, Burriel 2000, Berthelot και συν. 2002, Berthelot και συν. 2005).

Έμμεσοι τρόποι ανίχνευσης της αύξησης των σωματικών κυττάρων στο μαστικό έκκριμα είναι η δοκιμή California Mastitis Test (CMT) και η δοκιμή Whiteside Test (WST) (Schalm και συν. 1971).

Η δοκιμή CMT συνίσταται στην ανάμιξη περίπου 2 ml μαστικού εκκρίματος με ίση ποσότητα αντιδραστήριου (3% λαουρυλοθειικό νάτριο). Η ανάμιξη γίνεται με λήψη δείγματος μαστικού εκκρίματος 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 αντιδραστήριου και ανάμιξή τους με κυκλικές κινήσεις της συσκευής. Το αντιδραστήριο διαλύει το κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα των λευκοκυττάρων και απελευθερώνει το DNA, με το οποίο αντιδρά, σχηματίζοντας πήγμα (Φθενάκης 1993). Το αποτέλεσμα της αντίδρασης βαθμολογείται με πέντε βαθμούς αντίδρασης: "αρνητικό", "ίχνη", "1", "2", "3", και αντικατοπτρίζει τον αριθμό των σωματικών κυττάρων στο μαστικό έκκριμα. Βαθμολόγηση της αντίδρασης με τουλάχιστον "1", θεωρείται ενδεικτική υποκλινικής μαστίτιδας (Fthenakis 1995).

Η συσχέτιση μεταξύ δοκιμής CMT και του αριθμού σωματικών κυττάρων έχει τεκμηριωθεί σε πολλές μελέτες. Έτσι, τα αποτελέσματα "0" και "ίχνη" αντιστοιχούν σε αριθμό σωματικών κυττάρων μικρότερο από $0,25 \times 10^6$ κύτταρα ανά ml. Αποτελέσματα "2" και "3" αντιστοιχούν σε αριθμό σωματικών κυττάρων μεγαλύτερο από $0,5 \times 10^6$ κύτταρα ανά ml (Ziv, Shacked, Risenberg-Tiger 1968, Regi, Honegger, Buchi, Segessemann & Rusch 1991, Baumgartner, Pernthaner & Eibl 1992, Marco Melero 1994, Stefanakis και συν. 1995, Gonzalez-Rodriguez, Carmenes-Diez & Rodriguez 1996, McDougall και συν. 2001).

Η συσχέτιση μεταξύ αποτελεσμάτων της δοκιμής CMT και της βακτηριολογικής εξέτασης είναι μεγαλύτερη από 80% (Marco Melero 1994, Fthenakis 1995, Gonzalez-Rodriguez και συν. 1996), ενώ η ευαισθησία και η ειδικότητα της μεθόδου είναι μεγαλύτερες από 70% (Hueston,

Hartwig & Judy 1986). Επίσης, σημειώνεται ότι περισσότερα λανθασμένα θετικά αποτελέσματα στη δοκιμή CMT βρίσκονται στο τέλος της γαλακτικής περιόδου (Gonzalez-Rodriguez και συν. 1996). Επιπλέον, η μέθοδος πρέπει να εφαρμόζεται πριν την άρμεξη, ώστε να λαμβάνονται υπόψη μεταβολές στον αριθμό των σωματικών κυττάρων που σχετίζονται με το λαμβανόμενο κλάσμα του μαστικού εκκρίματος (Peris, Molina, Fernandez, Rodriguez & Torres 1991).

Με βάση τα παραπάνω, συμπεραίνεται ότι η δοκιμή CMT αποτελεί μία χρήσιμη, εύκολη και οικονομική μέθοδο για την ανίχνευση της υποκλινικής μαστίτιδας. Η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε ως συμπλήρωμα της βακτηριολογικής εξέτασης, είτε ως αρχική δοκιμή για την ταυτοποίηση ζώων στα οποία πρέπει να γίνει βακτηριολογική εξέταση (Margetin, Capistrak, Spanik & Foltys 1996, Wittek, Elze & Beck 1998, Pengov 2001).

Η δοκιμή WST συνίσταται στην ανάμιξη πέντε σταγόνων φρέσκου μαστικού εκκρίματος με μία σταγόνα 4% κανονικού (1 N) διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου. Η ανάμιξη γίνεται σε γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα μικροσκοπίου με ενστάλαξη του δείγματος μαστικού εκκρίματος, άμεση πρόσθεση του διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου και ανάμιξή τους με γυάλινη πιπέττα. Τα πυρηνικά οξέα των λευκοκυττάρων αντιδρούν με το υδροξείδιο του νατρίου και σχηματίζουν πηκτώδη μάζα, στην οποία προσροφώνται λιποσφαίρια του μαστικού εκκρίματος για το σχηματισμό ιζήματος. Το αποτέλεσμα της αντίδρασης βαθμολογείται και συσχετίζεται με τον αριθμό των σωματικών κυττάρων στο μαστικό έκκριμα (Φθενάκης 1993). Το αποτέλεσμα της αντίδρασης βαθμολογείται με έξι βαθμούς αντίδρασης: "-", "±", "1+", "2+", "3+", "4+" και αντικατοπτρίζει τον αριθμό των σωματικών κυττάρων στο μαστικό έκκριμα. Βαθμολόγηση της αντίδρασης με τουλάχιστον "1+", θεωρείται ενδεικτική υποκλινικής μαστίτιδας (Fthenakis 1995).

Η μέθοδος θεωρείται ακριβής για την ανίχνευση της υποκλινικής μαστίτιδας στις προβατίνες (El-Masannat 1987, Watkins και συν. 1991).

Η δοκιμή WST αποτελεί μία γρήγορη και αξιόπιστη δοκιμή για την ανίχνευση της υποκλινικής μαστίτιδας, μειονεκτεί όμως έναντι της δοκιμής CMT, επειδή δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε συνθήκες εκτροφής, αλλά απαιτεί την ύπαρξη εργαστηρίου.

Τύπος κυττάρων στο μαστικό έκκριμα

Κατά τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου, στο μαστικό έκκριμα υγιών προβάτων λιγότερο από 5% του συνολικού αριθμού κυττάρων είναι επιθηλιακά μαστικά κύτταρα. Τα υπόλοιπα είναι λευκοκύτταρα ("σωματικά κύτταρα"). Η αναλογία των τύπων των σωματικών κυττάρων είναι: 50 έως 70% μακροφάγα λευκοκύτταρα, 15 έως 40% ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα και 6 έως 15% λεμφοκύτταρα (Lee & Lascelles 1970α, Ranucci & Morgante 1993, Morgante και συν. 1996). Κατά τη διάρκεια της παλινδρόμησης του μαστικού αδένος, στο μαστικό

έκκριμα βρίσκεται περίπου ίση αναλογία μακροφάγων και ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων: 35 έως 45% από κάθε τύπο (Lee & Lascelles 1970β).

Σε περιπτώσεις μαστίτιδας, η πλειονότητα των κυττάρων στο μαστικό έκκριμα αποτελείται από ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα στο αρχικό στάδιο της μόλυνσης και από λεμφοκύτταρα και μακροφάγα σε μεταγενέστερο στάδιο (Outteridge & Lascelles 1966, Lee & Lascelles 1970α, Fthenakis & Jones 1990α, 1990β).

Στο αρχικό στάδιο (πρώτες 12 ώρες) της μόλυνσης, ο αριθμός των σωματικών κυττάρων στο μαστικό έκκριμα μπορεί να είναι φυσιολογικός, επειδή δεν έχει αρχίσει η είσοδος ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων στο μαστικό αδέν. Επιπλέον, σε περιπτώσεις μακροχρόνιας υποκλινικής μαστίτιδας παρουσιάζεται διακεκομμένη απομόνωση βακτηρίων από το μαστικό έκκριμα, ενώ ο αριθμός σωματικών κυττάρων σε αυτό παραμένει μεγαλύτερος από το κανονικό και μετά την παύση απομόνωσης βακτηρίων από το μαστικό αδέν (Fthenakis & Jones 1990α, 1990β).

Παράγοντες που επηρεάζουν τον αριθμό των σωματικών κυττάρων στο μαστικό έκκριμα

Η μόλυνση του μαστικού αδένου αποτελεί σαφώς το σημαντικότερο παράγοντα που επηρεάζει τον αριθμό και τον τύπο των σωματικών κυττάρων στο μαστικό έκκριμα (Peris και συν. 1991, Bergonier, Lagriffoul, Berthelot & Barillet 1996, Lagriffoul, Bergonier, Berthelot, Jacquin, Guillouet & Barillet 1996). Όμως και άλλοι παράγοντες μπορεί να επηρεάσουν τον αριθμό των σωματικών κυττάρων και πρέπει να λαμβάνονται υπόψη.

α. Η διαδικασία άρμεξης. Οι Ubertalle, Battaglini, Fortina, Bianchi & Rubino (1993) ανέφεραν ότι ο αριθμός σωματικών κυττάρων στο μαστικό έκκριμα προβάτων που αρμέγονταν με αρμεκτική μηχανή ήταν μεγαλύτερος ($0,3 \times 10^6$ κύτταρα ανά ml) από αυτόν στο μαστικό έκκριμα προβάτων που αρμέγονταν με το χέρι ($0,155 \times 10^6$ κύτταρα ανά ml).

β. Ο αριθμός γαλακτικής περιόδου. Οι Morgante και συν. (1996) παρατήρησαν ότι η μέση τιμή των σωματικών κυττάρων σε έκκριμα υγιών μαστικών αδένων κατά την πρώτη γαλακτική περίοδο των ζώων ήταν $0,057 \times 10^6$ κύτταρα ανά ml, δηλαδή πολύ χαμηλότερα από τη συνήθη μέση τιμή. Όσον αφορά σε γαλακτικές περιόδους μετά την πρώτη, ο Fthenakis (1996) και οι Suarez και συν. (2002) δεν παρατήρησαν διαφορές μεταξύ τους ως προς τον αριθμό των σωματικών κυττάρων στο έκκριμα.

γ. Το στάδιο της γαλακτικής περιόδου. Η αύξηση του αριθμού των σωματικών κυττάρων στο μαστικό έκκριμα κατά το τελευταίο στάδιο της γαλακτικής περιόδου υγιών προβάτων έχει τεκμηριωθεί σε πολλές μελέτες (Regi και συν. 1991, Baumgartner και συν. 1992, Margetin και

συν. 1995, Fthenakis 1996, Morgante και συν. 1996, Othmane, Carriedo, De La Fuente & San Primitivo 2002).

δ. Η ώρα της ημέρας. Έχει βρεθεί ότι ο αριθμός των σωματικών κυττάρων στο μαστικό έκκριμα της βραδινής άρμεξης είναι μεγαλύτερος από αυτόν στο έκκριμα της πρωινής (Fthenakis 1996).

ε. Το μέγεθος της τοκετοομάδας και το ύψος της γαλακτοπαραγωγής. Τα σωματικά κύτταρα στο μαστικό έκκριμα προβάτων που γαλουχούσαν δύο αμνούς βρέθηκε ότι ήταν περισσότερα από αυτά στο μαστικό έκκριμα προβάτων που γαλουχούσαν ένα αρνί (Gonzalo, Carriedo, Baro & San Primitivo 1994). Επίσης, αναφέρεται ότι υπάρχει αρνητική συσχέτιση μεταξύ του αριθμού σωματικών κυττάρων στο μαστικό έκκριμα και του ύψους της γαλακτοπαραγωγής των προβάτων (Dankow και συν. 1998), καθώς επίσης ότι στο μαστικό έκκριμα αρμεγόμενων προβάτων υπήρχε μεγαλύτερη συγκέντρωση ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων απ' ότι στο μαστικό έκκριμα θηλαζόμενων προβάτων (Albenzio, Taibi, Caroprese, Marino & Muscio 2003).

Γ. ΑΜΥΝΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΟ ΜΑΣΤΙΚΟ ΑΔΕΝΑ

Εισαγωγή

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η παθογένεια της μαστίτιδας εξαρτάται τόσο από τους λοιμογόνους παράγοντες του εισβάλλοντος μικροοργανισμού, όσο και από τους αμυντικούς μηχανισμούς του μαστικού αδένου του ζώου.

Η θηλή αποτελεί τον πρώτο φραγμό για την είσοδο των μικροοργανισμών στο μαστικό αδένου. Μετά την εισβολή των βακτηρίων, ο πιο σημαντικός αμυντικός μηχανισμός στο μαστικό αδένου των ζώων είναι η φαγοκυττάρωση των βακτηρίων από τα λευκοκύτταρα. Στην αντιμετώπιση των εισβαλλόντων μικροοργανισμών μικρότερο ρόλο διαδραματίζουν και οι χυμικοί αμυντικοί μηχανισμοί (Paape, Bannerman, Zhao & Lee 2003, Pyorala 2003).

Σημειώνεται ότι το μεγαλύτερο μέρος της διαθέσιμης βιβλιογραφίας αναφέρεται στο μαστικό αδένου των αγελάδων. Μολοταύτα παρατίθεται εδώ, δεδομένου ότι ένα τμήμα της παρούσας διατριβής διαπραγματεύεται θέματα αμυντικών μηχανισμών του μαστικού αδένου.

Η θηλή

Η θηλή αποτελεί ένα φραγμό για την εισβολή των μικροοργανισμών στο μαστικό αδένου, καθώς στη μεγάλη πλειονότητα των περιπτώσεων τα βακτήρια εισβάλλουν στο μαστικό αδένου μέσω αυτής. Έτσι αποτελεί και την "πρώτη γραμμή" των αμυντικών συστημάτων του μαστικού αδένου.

Ο αμυντικός ρόλος της θηλής ασκείται κατ'αρχήν από τη δημιουργία ενός μηχανικού φραγμού στην είσοδο των βακτηρίων και αφετέρου από την ύπαρξη ειδικών αντιβακτηριακών ουσιών μέσα σε αυτήν (Craven & Williams 1985). Η αποτελεσματική σύγκλιση της θηλής μεταξύ των αρμεγμάτων εμποδίζει την είσοδο παθογόνων μικροοργανισμών, με αποτέλεσμα τη μείωση του ποσοστού προσβολής από μαστίτιδα (Nickerson & Pankey 1983).

Ο θηλαίος πόρος καλύπτεται εσωτερικά από την κηρώδους υφής κεράτινη στιβάδα (Nickerson 1987). Η απομάκρυνση της κεράτινης στιβάδας έχει συσχετιστεί με αυξημένο ποσοστό προσβολής από μαστίτιδα, λόγω της πιο εύκολης δυνατότητας εισβολής και αποικιοποίησης από μικροοργανισμούς (Craven & Williams 1985, Caruco και συν. 1992). Η

κερατίνη παρέχει προστασία στο μαστικό αδένα, προσροφώντας τα εισβάλλοντα βακτήρια και απομακρύνοντάς τα μέσω της απομάκρυνσης της ίδιας κατά την άρμεξη (Williams & Mein 1985). Επιπλέον, κατά την ξηρά περίοδο, η κερατίνη κλείνει ολοκληρωτικά το θηλαίο πόρο, προστατεύοντας έτσι αποτελεσματικά το μαστικό αδένα (Nickerson 1987).

Τα λευκοκύτταρα που κυριαρχούν στο επιθήλιο του θηλαίου πόρου είναι τα λεμφοκύτταρα και τα πλασμοκύτταρα (Nickerson 1987). Ο θηλαίος πόρος στο κεντρικό σημείο του διαχωρίζεται σαφώς από το θηλαίο κόλπο μέσω ενός συνόλου πτυχώσεων, οι οποίες σχηματίζουν ένα εσωτερικό στόμιο. Στην περιοχή αυτή τα κύτταρα της επιφάνειας γίνονται πιο στρόγγυλα και εξέχοντα με αραιές μικρολάχνες. Στις αγελάδες βρίσκεται εκεί περιοχή λεμφικού ιστού με σημαντική αμυντική δράση. Εκεί υπάρχει πληθώρα πλασμοκυττάρων, τα οποία παράγουν ανοσοσφαιρίνες (IgG₁, IgM και IgA) (Collins & Oldham 1986). Η πληθώρα και η εκτεταμένη διάχυση των λεμφοκυττάρων, η συσσώρευση πλασμοκυττάρων και η ύπαρξη λεμφικού ιστού στην περιοχή, αποδεικνύουν τη συμβολή της θηλής στην ανάπτυξη μηχανισμών τοπικής χυμικής ανοσίας (Hibbitt 1984, Collins & Oldham 1986).

Επιπλέον, στην κεράτινη στιβάδα της θηλής έχουν ανιχνευτεί και αντιμικροβιακοί παράγοντες (Treese, Morese & Levy 1966). Τα λιπαρά οξέα μακράς αλύσου (μυριστικό οξύ, παλμιτολεϊκό οξύ, λινολεϊκό οξύ) που υπάρχουν σε αυτήν, έχουν βακτηριοστατικές ιδιότητες (Hogan, Duthie & Pankey 1986). Επιπλέον, οι κατιονικές πρωτεΐνες της δεσμεύουν τα εισβάλλοντα βακτήρια, μεταβάλλοντας την τάση της κυτταρικής μεμβράνης τους, ώστε να είναι ευαίσθητα σε αλλαγές της ωσμωτικής πίεσης κατά τη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης (Senft, Meyer & Hartmann 1980).

Μολοταύτα, κάποια βακτήρια επιβιώνουν και εισβάλλουν στο θηλαίο κόλπο, όπου και συναντούν τη "δεύτερη γραμμή" άμυνας. Στο θηλαίο κόλπο κινητοποιούνται οι κυτταρικοί και χυμικοί αμυντικοί μηχανισμοί του μαστικού αδένα (Craven & Williams 1985, Paape, Schultze & Guidry 1985), όπως θα αναλυθεί περαιτέρω.

Κυτταρικοί αμυντικοί μηχανισμοί

Εάν τα βακτήρια υπερκεράσουν τον αμυντικό φραγμό του θηλαίου πόρου, κατευθύνονται προς το θηλαίο κόλπο και το μαστικό αδένα, όπου αντιμετωπίζονται από τους κυτταρικούς αμυντικούς μηχανισμούς. Ο αμυντικός ρόλος των λευκοκυττάρων περιγράφεται περιληπτικά στον Πίνακα 1.1 και αναλύεται παρακάτω.

Πίνακας 1.1. Συνοπτική παρουσίαση του αμυντικού ρόλου των λευκοκυττάρων στο μαστικό αδέν.

Τύπος λευκοκυττάρων	Αμυντικός ρόλος
Μακροφάγα	Ενεργοποίηση και διατήρηση της διαδικασίας της φλεγμονής, φαγοκυττάρωση και θανάτωση βακτηρίων, παρουσίαση αντιγόνου στα λευκοκύτταρα και ενεργοποίηση κυτταρικής ανοσίας στο σύστημα του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας
Ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα	Φαγοκυττάρωση και θανάτωση βακτηρίων, παραγωγή αντιβακτηριακών παραγόντων
T-λεμφοκύτταρα	
CD4+	Παραγωγή ανοσορρυθμιστικών κυτοκινών μετά την αναγνώριση του αντιγόνου και την ενεργοποίηση της κυτταρικής ανοσίας, κύτταρα μνήμης
CD8+	Παραγωγή κυτοκινών που ρυθμίζουν τις λειτουργίες των λευκοκυττάρων
γδ T-λεμφοκύτταρα	Ασαφής αμυντικός ρόλος στο μαστικό αδέν
B-λεμφοκύτταρα	
Ωριμα B-λεμφοκύτταρα	Διευκόλυνση της παρουσίασης του αντιγόνου, κύτταρα μνήμης
Πλασμοκύτταρα	Παραγωγή ανοσοσφαιρινών και κυτοκινών για ρύθμιση χυμικών αμυντικών μηχανισμών

Μακροφάγα

Τα μακροφάγα στο μαστικό ιστό προέρχονται από τα μονοκύτταρα του αίματος. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, αποτελούν τη μεγαλύτερη αναλογία σωματικών κυττάρων στο έκκριμα του υγιούς μαστικού αδέν και ως εκ τούτου αποτελούν και τον πρώτο κυτταρικό αμυντικό μηχανισμό του μαστικού αδέν.

Τα μακροφάγα κινητοποιούνται είτε μετά την αναγνώριση λοιμογόνων παραγόντων που παράγουν τα βακτήρια, είτε από τους αμυντικούς μηχανισμούς του μαστικού αδέν (κυτοκίνες προερχόμενες από T-λεμφοκύτταρα, ανοσοσφαιρίνες). Αποστολή τους είναι κυρίως η ενεργοποίηση της διαδικασίας της φλεγμονής και αφετέρου η φαγοκυττάρωση των εισβαλλόντων βακτηρίων, ενώ στον παλινδρομούντα μαστικό αδέν συμμετέχουν επίσης στην απομάκρυνση του λίπους (Outteridge & Lee 1981, Sordillo & Streicher 2002). Συγκεκριμένα, απελευθερώνουν χημειοτακτικούς παράγοντες για τα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα και προκαλούν τον πολλαπλασιασμό των T-λεμφοκυττάρων (Craven 1986). Τα μακροφάγα είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά κατά βακτηρίων τα οποία μπορούν να επιβιώνουν μέσα στα άλλα φαγοκύτταρα (π.χ. Σταφυλόκοκκοι) (Monks, Geske, Lehman & Fadok 2002).

Στο φλεγμαίνοντα μαστικό αδέν ο αριθμός των μακροφάγων είναι μικρότερος από αυτόν των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων. Επιπλέον, έχουν μικρό αριθμό υποδοχέων F_c (Niemiłowski, Nonnecke & Targowski 1988), οπότε μειώνεται ο ρυθμός με τον οποίο φαγοκυτταρώνουν. Έτσι, θεωρείται ότι, όταν είναι παρόντα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα, ο

κύριος ρόλος των μακροφάγων είναι η διατήρηση της συνεχούς προσέλευσης αυτών των κυττάρων στο μαστικό αδέν. Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα απελευθερώνουν ενδιάμεσους παράγοντες φλεγμονής (προσταγλανδίνες, λευκοτριένια, κυτοκίνες), προάγοντας τη διαδικασία αυτή (Adams & Hamilton 1988, Persson, Larsson & Sandgren 1993). Όσον αφορά στις κυτοκίνες σημειώνεται ότι στο μαστικό αδέν τα μακροφάγα παράγουν έως και 50% μικρότερη ποσότητα ιντερλευκίνης-1 σε σύγκριση με τα μονοκύτταρα στο αίμα (Politis, McBride, Burton, Zhao & Turner 1991). Πάντως, τα μακροφάγα συντελούν στη λύση της φλεγμονής φαγοκυτταρώνοντας ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα, που έχουν οδηγηθεί σε απόπτωση (Sladek & Rysanek 2001).

Καθώς τα μακροφάγα έρχονται σε επαφή με τα βακτήρια ή με το ενεργοποιημένο συμπλήρωμα C5a, ενεργοποιείται η κυτταρική ανοσία στο μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (σύστημα MHC) (Fitzpatrick, Cripps, Hill, Bland & Stokes 1992, International Dairy Federation 2003). Σημειώνεται ότι στο μαστικό αδέν τα μακροφάγα έχουν μικρότερη ικανότητα έκφρασης των μορίων του συστήματος MHC σε σχέση με τα μονοκύτταρα του αίματος (Politis και συν. 1992). Αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία, καθώς η ικανότητα των μακροφάγων να αναγνωρίζουν το αντιγόνο, το οποίο "παρουσιάζουν" στα λεμφοκύτταρα, έχει συσχετισθεί άμεσα με την ποσότητα των μορίων του συστήματος MHC, που παράγουν τα μακροφάγα (Politis, Zhao, McBride & Burton 1992).

Σημειώνεται πάντως ότι η δραστηριότητα των μακροφάγων στην αμέσως μετά τον τοκετό περίοδο είναι μειωμένη (Osterlundh, Holst & Magnusson 1998, Sordillo & Streicher 2002), πιθανόν λόγω της μειωμένης οψωνοποιητικής δυνατότητας στο μαστικό αδέν και το μαστικό έκκριμα, η οποία είναι αποτέλεσμα της μειωμένης συγκέντρωσης της ανοσοσφαιρίνης IgM (Walker 2000). Κατά την ίδια περίοδο μειώνεται και η έκφραση του συστήματος MHC II από τα μακροφάγα, με αποτέλεσμα την ατελή "παρουσίαση" των αντιγόνων και τελικά την πιο ασθενή ανοσολογική ανταπόκριση από τα λεμφοκύτταρα του μαστικού αδέν (Fitzpatrick και συν. 1992, Mallard, Dekkers, Ireland, Leslie, Sharif, Van Kampen, Wagter & Wilkie 1998). Αυτό εξηγεί και την αυξημένη συχνότητα μαστίτιδας στην αμέσως μετά τον τοκετό περίοδο, η οποία αποτελεί σημαντικό νοσολογικό πρόβλημα στις αγελαδοτροφικές εκμεταλλεύσεις.

Ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα

Τα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα διαδραματίζουν τον πιο σημαντικό ρόλο για την προστασία του μαστικού αδέν κατά την οξεία φάση της φλεγμονής στο μαστικό αδέν, καθώς μεταναστεύουν από το αίμα προς το μαστικό αδέν.

Τα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα χαρακτηρίζονται από έναν πολυμορφικό-λοβωτό πυρήνα (Paape & Wergin 1977, Paape, Wergin, Guidry & Pearson 1979), πολλά κυτταροπλασματικά κοκκία τα οποία παρέχουν τις ουσίες για τη θανάτωση των βακτηρίων (Jain 1986) και νησίδα με αποθέματα γλυκογόνου ως ενεργειακή πηγή (Jain 1986). Στην εξωτερική επιφάνειά τους υπάρχουν υποδοχείς, οι οποίοι χρησιμεύουν: (α) για την ανίχνευση και προσκόλληση παραγόντων, ώστε να αρχίσει η μετανάστευσή τους προς το σημείο της φλεγμονής (Craven 1986, Caswell, Middleton & Gordon 2001), (β) ως ψευδοπόδια για τη μετακίνησή τους προς το σημείο της φλεγμονής (Howard, Taylor & Brownlie 1980), (γ) για την προσκόλληση των ανοσοσφαιρινών και των παραγόντων του συμπληρώματος, ώστε να ξεκινήσει η διαδικασία της φαγοκυττάρωσης (Howard και συν. 1980, Arnaout, Melamed, Tack & Colten 1981), (δ) για την προσκόλληση βακτηριακών τοξινών και κυτοκινών, ώστε να πραγματοποιηθεί η πρωτεϊνική φωσφορυλίωση που είναι απαραίτητη για την έκφραση των αμυντικών μηχανισμών των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων (Carlo, Paape & Miller 1996, Wang, Zarlenga, Paape & Dahl 1997).

Τα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα μεταναστεύουν με χημειοτακτισμό από το αίμα προς τη θηλή και το μαστικό αδένα, καθώς με την έναρξη της παραγωγής λοιμογόνων παραγόντων από τα βακτήρια ενεργοποιούνται τα μακροφάγα και τα επιθηλιακά κύτταρα στο θηλαίο πόρο και το μαστικό παρέγχυμα και παράγουν κυτοκίνες, οι οποίες προσελκύουν τα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα στη συγκεκριμένη περιοχή. Τα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα εμφανίζονται αρχικά στη θηλή 30 έως 60 min. μετά την είσοδο του βακτηρίου, η δε μεγαλύτερη συγκέντρωσή τους επιτυγχάνεται μετά από 1 έως 2 ώρες. Στη συνέχεια, 2 έως 4 ώρες μετά την είσοδο του βακτηρίου, βρίσκονται και στο μαστικό παρέγχυμα (Persson 1992).

Κύρια λειτουργία των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων είναι η φαγοκυττάρωση των μικροοργανισμών και η ενδοκυτταρική θανάτωσή τους, ρόλος ο οποίος ενισχύεται με τις οψωνίνες (Craven & Williams 1985, Paape, Miller & Ziv 1991). Τα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα περιέχουν "αζουροφιλικά" (πρωτοταγή) κοκκία, "ειδικά" (δευτεροταγή) και "νέα" (τριτοταγή) κοκκία (Gennaro, Dewald, Horisberger, Gubler & Baggiolini 1983). Η πιο σημαντική αντιβακτηριακή ουσία που περιέχεται στα αζουροφιλικά κοκκία είναι η υπεροξειδάση (Klebanoff 1970), η οποία συντελεί στην ενδοκυτταρική θανάτωση των βακτηρίων. Σημειώνεται ότι στα αζουροφιλικά κοκκία των βοοειδών περιέχεται και λυσοζύμη, σε μικρή όμως ποσότητα (Rausch & Moore 1975). Στα ειδικά κοκκία, τα οποία στα ώριμα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα βρίσκονται σε μεγαλύτερο αριθμό από τα αζουροφιλικά, δεν περιέχεται υπεροξειδάση. Τα "νέα" κοκκία είναι μεγαλύτερου μεγέθους από τα άλλα, κυριαρχούν στα ώριμα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα και περιέχουν την πλειονότητα των αντιμικροβιακών πρωτεϊνών: γαλακτοσιδηρίνη, κατιονικές

πρωτεΐνες (βακτηνεκτικές) και β-αμυντικές πρωτεΐνες (Gennaro και συν. 1983, Baggiolini, Horisberger, Gennaro & Dewald 1985).

Οι κατιονικές πρωτεΐνες δρουν καταστρέφοντας την κυτταρική μεμβράνη της *E. coli*, ενώ οι β-αμυντικές πρωτεΐνες έχουν έντονη αντιβακτηριακή δραστηριότητα έναντι όλων των παθογόνων μικροοργανισμών (Savoini, Marzari, Dolzani, Serrano, Graziosi, Gennaro & Romeo 1984, Yount, Yuan, Tarver, Castro, Diamond, Tran, Levy, McCullough, Cullor, Bevins & Selsted 1999). Επιπλέον, τα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα εκλύουν πρωτεϊνάσες, ρίζες οξυγόνου, προσταγλανδίνες και λευκοτριένια, ώστε να προάγεται η διαδικασία της φλεγμονής και να συνεχίζεται η μετανάστευση των λευκοκυττάρων προς το μαστικό αδένα (Paape και συν. 2003). Σημειώνεται πάντως ότι εκλύοντας τις παραπάνω χημικές ουσίες δεν προκαλείται μόνο θανάτωση των βακτηρίων, αλλά επίσης και καταστροφή στο μαστικό αδένα, καθώς εντείνεται η φλεγμονή (Caruso, Paape & Nickerson 1986, Sandgren 1991). Γι' αυτό το λόγο, μετά από κάποιο χρονικό διάστημα, τα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα οδηγούνται σε απόπτωση, η οποία είναι προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, έτσι ώστε να επιτευχθεί η λύση της φλεγμονής και να προστατευθεί το μαστικό παρέγχυμα (Sladek & Rysanek 2001).

Η ικανότητα φαγοκυττάρωσης και ενδοκυτταρικής θανάτωσης από τα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα μετά τη μετανάστευσή τους στο μαστικό αδένα, είναι μικρότερη απ' ό,τι στο αίμα. Τα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα που εισέρχονται στο θηλαίο κόλπο κατά την αρχική φάση της φλεγμονής (δηλαδή αμέσως μετά την είσοδο ενός μικροοργανισμού), εμφανίζουν ιδιαίτερα έντονη ικανότητα φαγοκυττάρωσης (Sandgren 1991). Στη συνέχεια, όμως, τα λευκοκύτταρα φαγοκυτταρώνουν λιποσφαίρια και καζεϊνικά μικύλλια (αντί των βακτηρίων), οπότε τα κυτταροπλασματικά κοκκία τους σχηματίζουν φαγολυσσοσώματα με τα γαλακτικά στοιχεία. Έτσι, μειώνεται η ικανότητά τους για ενδοκυτταρική θανάτωση των βακτηρίων (Paape, Guidry, Kirk & Bolt 1975, Paape & Guidry 1977). Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα λίπους στο γάλα των προβάτων απ' ό,τι στο γάλα των αγελάδων και των αιγών, οδήγησε το Jones (1984) στην υπόθεση ότι ο μαστικός αδένας των προβάτων πιθανόν ήταν περισσότερο ευπρόσβλητος από αυτόν των άλλων δύο ζωικών ειδών, επειδή ο αυξημένος αριθμός λιποσφαιρίων προδιέθετε σε αναποτελεσματικότητα των φαγοκυτταρικών μηχανισμών του μαστικού αδένου.

Επιπλέον, τα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα στο μαστικό αδένα περιέχουν έως 38% λιγότερο γλυκογόνο από αυτά στο αίμα, διότι κατά τη μετανάστευσή τους προς το μαστικό αδένα έχει ήδη καταναλωθεί κάποιο τμήμα των ενεργειακών αποθεμάτων τους (Newbould 1973). Έτσι, η διαθέσιμη ενέργεια, η οποία είναι απαραίτητη για τη φαγοκυττάρωση, είναι μειωμένη. Επιπλέον, στο φλεγμαίνοντα μαστικό αδένα το διαθέσιμο οξυγόνο, το οποίο είναι επίσης

απαραίτητο για την αντιβακτηριακή δραστηριότητα των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων, είναι μειωμένο (Mayer, Craven, Keen & Bourne 1988).

Η ικανότητα των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων να αντιμετωπίζουν τους εισβάλλοντες μικροοργανισμούς είναι καθοριστικός παράγοντας για την έκβαση κάθε ενδομαστικής μόλυνσης. Έτσι, έχει βρεθεί ότι η φαγοκυτταρική ικανότητα των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων επηρεάζεται από την ηλικία του ζώου, από το στάδιο της γαλακτικής περιόδου (Mehrzad, Dosogne, Vangroenweghe & Burvenich 2001), από το μολύνον στέλεχος του μικροοργανισμού (Barrio, Vangroenweghe, Dosogne & Burvenich 2000), από την προσλαμβανόμενη ποσότητα βιταμίνης Ε και σεληνίου (Hemingway 1999), καθώς επίσης από τα φάρμακα που χορηγούνται για την αντιμετώπιση της μαστίτιδας. Πιστεύεται ότι η χορήγηση γλυκοκορτικοειδών, φθοριοκινολονών, αμινογλυκοσιδών, τετρακυκλινών και β-λακταμών μειώνει τη φαγοκυτταρική ικανότητα των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων (Paape και συν. 2003).

Λεμφοκύτταρα

Τα λεμφοκύτταρα έχουν ειδικούς υποδοχείς στην κυτταρική μεμβράνη τους, μέσω των οποίων μπορούν να αναγνωρίζουν τα αντιγόνα, καθορίζοντας έτσι μία ειδικότητα στη δράση τους. Στο μαστικό αδένά βρίσκονται Τ-λεμφοκύτταρα, Β-λεμφοκύτταρα και πλασμοκύτταρα (Nickerson & Pankey 1983). Όσον αφορά στις υποκατηγορίες των λεμφοκυττάρων, στον υγιή μαστικό αδένά των αγελάδων κυριαρχούν τα $\alpha\beta$ Τ-λεμφοκύτταρα τύπου CD8+. Η συγκέντρωση των Τ-λεμφοκυττάρων διαφέρει ανάλογα με το στάδιο της γαλακτικής περιόδου και είναι μειωμένη στην αρχή της γαλακτικής περιόδου (Weaver, Pighetti & Sordillo 1996, Van Kampen & Mallard 1997), ενώ η συγκέντρωση των Β-λεμφοκυττάρων παραμένει σταθερή (Weaver και συν. 1996).

Σε περίπτωση μαστίτιδας κυριαρχούν τα $\alpha\beta$ Τ-λεμφοκύτταρα τύπου CD4+, τα οποία ενεργοποιούνται ανταποκρινόμενα στην ενεργοποίηση του συστήματος MHC II από τα μακροφάγα ή τα Β-λεμφοκύτταρα (Sordillo & Streicher 2002). Από τα Β-λεμφοκύτταρα προέρχονται επίσης τα πλασμοκύτταρα, τα οποία παράγουν ανοσοσφαιρίνες και κυτοκίνες, από τις οποίες ρυθμίζεται περαιτέρω η κυτταρική και η χυμική ανοσία. Επιπλέον, τα Β-λεμφοκύτταρα "παρουσιάζουν" το αντιγόνο στα Τ-λεμφοκύτταρα, οπότε παράγεται IL-2 από αυτά, με τη δράση της οποίας τα Β-λεμφοκύτταρα διαφοροποιούνται σε πλασμοκύτταρα ή σε κύτταρα μνήμης.

Χυμικοί αμυντικοί μηχανισμοί

Πέραν των κυτταρικών αμυντικών μηχανισμών στο μαστικό αδένα είναι διαθέσιμοι και χυμικοί αμυντικοί μηχανισμοί. Σε αυτούς περιλαμβάνονται: (α) οι κυτοκίνες IL-1, IL-2, IL-8, παράγοντας ενεργοποίησης κοκκιοκυττάρων/μακροφάγων και TNF- α , (β) οι ανοσοσφαιρίνες που είτε φτάνουν στο μαστό και τη θηλή με το αίμα, είτε παράγονται τοπικά από τα πλασμοκύτταρα, (γ) το συμπλήρωμα, (δ) η γαλακτοσιδηρίνη, (ε) το σύστημα γαλακτοπεροξειδάσης / θειοκυανικών ιόντων / υπεροξειδίου του υδρογόνου, (στ) η λυσοζύμη. Ο αμυντικός ρόλος τους περιγράφεται περιληπτικά στον πίνακα I.ii και αναλύεται παρακάτω.

Πίνακας I.ii. Συνοπτική παρουσίαση των χυμικών αμυντικών μηχανισμών στο μαστικό αδένα.

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

Πίνακας I.ii. Συνοπτική παρουσίαση των χυμικών αμυντικών μηχανισμών στο μαστικό αδέν (συνέχεια).

Αμυντικός μηχανισμός	Αμυντικός ρόλος
Συμπλήρωμα	Αντιβακτηριακός ρόλος, υποβοήθηση της φαγοκυττάρωσης
Γαλακτοσιδηρίνη	Δέσμευση του σιδήρου και μείωση της διαθεσιμότητάς του για τα βακτήρια, προαγωγή της φαγοκυττάρωσης
Σύστημα γαλακτοπεροξειδάσης/ θειοκυανικών ιόντων / υπεροξειδίου του υδρογόνου	Αντιβακτηριακός ρόλος μέσω παραγωγής αντιοξειδωτικών παραγόντων
Λυσοζύμη	Αντιβακτηριακή δράση, παρεμπόδιση της αποικιοποίησης από τα βακτήρια, υποβοήθηση της φαγοκυττάρωσης

Κυτοκίνες

Οι κυτοκίνες είναι μία ομάδα ρυθμιστικών πρωτεϊνών, που δρουν ως ενδοκυτταρικά επικοινωνιακά "σήματα", εκκρίνονται σε μικρές ποσότητες και έχουν πολλαπλές βιολογικές δραστηριότητες (Schijns & Horzinek 1997). Οι κυτοκίνες παράγονται από πολλά και διάφορα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όμως τα μακροφάγα και τα Τ-λεμφοκύτταρα είναι τα κύρια σημεία παραγωγής τους. Διαφορετικές κυτοκίνες, αν και με διαφορετική δομή, συνδέονται στους ίδιους υποδοχείς και ο συνδυασμός τους μπορεί να έχει συνεργική ή ανταγωνιστική δράση. Το σύμπλεγμα αυτό της αλληλοεπίδρασης των κυτοκινών περιγράφεται ως "δίκτυο κυτοκινών".

Οι κυτοκίνες έχουν σημαντικό ανοσορρυθμιστικό ρόλο στην άμυνα του μαστικού αδέν και την εξέλιξη της μαστίτιδας (Sordillo & Babiuk 1991, Sordillo, Redmond, Campos, Warren & Babiuk 1991, Daley, Williams, Dougherty, Furda, Hayes & Coyle 1993). Οι παράγοντες IL-1β, IL-8, TNF-α έχουν ανιχνευθεί στο μαστικό έκκριμα κατά τη φάση της φλεγμονής, ενώ μικρές ποσότητες των GM-CSF και INF-γ έχουν επίσης βρεθεί περιστασιακά (Waller, Colditz & Seow 1997). Οι κυτοκίνες IL-1β, TNF-α, IL-8 και ο παράγοντας GM-CSF συμβάλλουν στην ταχεία προσέλευση των κυττάρων της φλεγμονής στο μαστικό αδέν (Persson, Colditz, Flapper, Franklin & Seow 1996).

Συγκεκριμένα, σε περιπτώσεις βακτηριακής μόλυνσης οι IL-2 και IFN-γ ρυθμίζουν τους κυτταρικούς αμυντικούς μηχανισμούς (τύπος Th1), ενώ οι IL-4, IL-5 και IL-10 τους χυμικούς αμυντικούς μηχανισμούς στο μαστικό αδέν (τύπος Th2). Κατά την αμέσως μετά τον τοκετό περίοδο, η IL-2 και η IFN-γ παράγονται σε μικρές ποσότητες, ενώ αντίθετα παράγονται μεγαλύτερες ποσότητες IL-4 και IL-10 (Weaver, Corl & Sordillo 1999). Σημειώνεται ότι σημαντικός παράγοντας στο είδος των κυκλοφορούντων κυτοκινών είναι το στάδιο της

γαλακτοπαραγωγής, καθώς οι παράγοντες IL-8, GM-CSF και TNF-α βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση σε ζώα που βρίσκονται στη γαλακτική περίοδο, οπότε οι παράγοντες IL-β, INF-γ ανιχνεύονται σε μικρότερη ποσότητα και περιστασιακά. Πάντως σε ζώα στη ξηρά περίοδο, όλοι οι παράγοντες ανιχνεύονται σε πάρα πολύ μικρές ποσότητες (Persson και συν. 1996).

Ανοσοσφαιρίνες

Στο μαστικό αδένα των αγελάδων έχουν ανιχνευτεί τέσσερις ισότυποι ανοσοσφαιρινών: οι IgG1, IgG2, IgA και IgM. Η συγκέντρωση των ανοσοσφαιρινών είναι χαμηλή στο φυσιολογικό μαστικό έκκριμα. Αντίθετα, αυξάνεται στο έκκριμα σε περιπτώσεις μαστίτιδας, καθώς και κατά την παλινδρόμηση του μαστικού αδένα (Anderson, Smith, Shanks, Whitmore, Davis & Gustafsson 1986, Guidry & Miller 1986, Sordillo, Nickerson, Akers & Oliver 1987, Doymaz, Sordillo, Oliver & Guidry 1988, Norcross 1991).

Οι ανοσοσφαιρίνες προέρχονται από τον ορό του αίματος ή παράγονται τοπικά από πλασμοκύτταρα της θηλής ή του μαστικού αδένα (Craven & Williams 1985, Norcross 1991). Η IgG1, η οποία αποτελεί τον κύριο τύπο ανοσοσφαιρίνης στον υγιή μαστικό αδένα, προέρχεται κυρίως από τον ορό του αίματος, η IgA και η IgM παράγονται τοπικά, ενώ η IgG2, η οποία αποτελεί τον κύριο τύπο ανοσοσφαιρίνης στο φλεγμαινόντα μαστικό αδένα, προέρχεται και από τις δύο πηγές. Πλασμοκύτταρα υπάρχουν στο μαστικό ιστό και στη θηλή (Collins & Oldham 1986, Doymaz και συν. 1988). Σε περιπτώσεις φλεγμονής, οι IgG1 και IgG2 διαχέονται παθητικά από τον ορό του αίματος στις εκκρίσεις του μαστικού αδένα, καθώς αυξάνονται η διαπερατότητα των αγγείων και η είσοδος των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων (Anderson και συν. 1986). Επιπλέον, η IgG2 μεταφέρεται με τα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα, μέσω της προσκόλλησής της σε αυτά (Paape και συν. 1991).

Οι ανοσοσφαιρίνες θεωρείται ότι αναστέλλουν την προσκόλληση των βακτηρίων στα μαστικά επιθηλιακά κύτταρα, εξουδετερώνουν τις βακτηριακές τοξίνες και δρουν κυτταρολυτικά (Craven & Williams 1985, Norcross 1991). Επιπλέον, η IgG1, η IgG2 και η IgM οψωνοποιούν τα βακτήρια υποβοηθώντας έτσι την λειτουργία των φαγοκυττάρων (Guidry & Miller 1986).

Συμπλήρωμα

Το σύστημα του συμπληρώματος υποβοηθά τα αμυντικά συστήματα του μαστικού αδένα μέσω των αντιβακτηριακών και οψωνοποιητικών ιδιοτήτων του, καθώς και μέσω της προαγωγής της φλεγμονής. Στον υγιή μαστικό αδένα η συγκέντρωση των παραγόντων του συμπληρώματος

είναι μικρή, φθάνοντας έως και 0,1% της συγκέντρωσης στον ορό του αίματος (Rainard 2003), αλλά αυξάνεται υπερβολικά στο πρωτόγαλα, κατά την ξηρά περίοδο, καθώς και σε περιπτώσεις μαστίτιδας (Colditz & Maas 1987). Στον υγιή μαστικό αδένα βρίσκεται κυρίως ο παράγοντας C5a, ενώ σε περιπτώσεις μαστίτιδας βρίσκονται οι παράγοντες C5a και C3. Σημειώνεται ότι ο παράγοντας C1q, ο οποίος αποτελεί το κύριο συστατικό του συστήματος στον ορό του αίματος, δεν έχει ανιχνευθεί στο μαστικό αδένα (Rainard & Routrel 1995). Η προέλευση των παραγόντων του συμπληρώματος στο μαστικό αδένα δεν είναι απολύτως γνωστή. Πιστεύεται πάντως ότι προέρχονται από τον ορό του αίματος, αν και η αδιαπερατότητα του μαστικού επιθηλίου μάλλον αποτελεί τον περιοριστικό παράγοντα για την είσοδό τους στο μαστικό αδένα σε μεγάλη ποσότητα (Rainard & Routrel 1995, Rainard 2003). Αυτός ο φραγμός αποδυναμώνεται σε περιπτώσεις φλεγμονής, οπότε οι παράγοντες του συμπληρώματος μπορούν να εισέλθουν στο μαστικό αδένα και να συμβάλουν στην άμυνα του μαστικού αδένα.

Λόγω της απουσίας του παράγοντα C1q, η κλασική οδός ενεργοποίησης του συμπληρώματος δεν μπορεί να λειτουργήσει στο μαστικό αδένα. Έτσι ενεργοποιείται η εναλλακτική οδός, με την οποία παράγεται ο παράγοντας C5 και οι παράγοντες C3b και C3bi συνδέονται με τα βακτήρια. Οι αμυντικές λειτουργίες που επιτυγχάνονται με αυτούς τους παράγοντες είναι η οψωνοποίηση των μικροοργανισμών (C3b, C3bi), η προαγωγή της φαγοκυττάρωσης (C3b), ο χημειοτακτισμός των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων (C4a, C5a) και η λύση των κυτταρικών μεμβρανών των βακτηρίων (C5b-9) (Craven & Williams 1985, Persson και συν. 1993, Rainard & Routrel 1995, 2000, Rainard 2003). Σημειώνεται, πάντως, ότι η συμβολή του συστήματος του συμπληρώματος στην άμυνα του μαστικού αδένα δεν έχει διαλευκανθεί.

Γαλακτοσιδηρίνη

Η γαλακτοσιδηρίνη είναι μία γλυκοπρωτεΐνη που βρίσκεται στο μαστικό έκκριμα, τη σίελο, τα δάκρυα και τις ρινικές εκκρίσεις (Masson, Heremans & Dive 1966). Αν και η συγκέντρωσή της είναι μικρή στο γάλα από υγιείς μαστικούς αδένες, αυτή αυξάνεται κατά την παλινδρόμηση και τη φλεγμονή του μαστικού αδένα (Harmon, Schanbacher, Ferguson & Smith 1975, Harmon & Newbould 1980, Smith & Oliver 1981, Sordillo και συν. 1987, Carlsson, Bjork & Persson 1989). Είναι επίσης αξιοσημείωτο ότι κατά την ξηρά περίοδο βρίσκεται σε μολυσμένους μαστικούς αδένες σε χαμηλότερη συγκέντρωση απ' ό,τι σε μη μολυσμένους (Sordillo και συν. 1987). Πηγή προέλευσης της γαλακτοσιδηρίνης στο μαστικό έκκριμα θεωρείται ότι είναι οι εκκριτικές αδενοκυψελίδες (Masson και συν. 1966).

Η γαλακτοσιδηρίνη δεσμεύει το διαθέσιμο σίδηρο, εμποδίζοντας έτσι την ανάπτυξη βακτηρίων που χρειάζονται σίδηρο, για παράδειγμα των *E. coli*, *Kl. pneumoniae* και *M. haemolytica* (Goodman & Schanbacher 1991, Schanbacher, Goodman & Talhouk 1993). Όμως, τα κιτρικά ιόντα στο μαστικό έκκριμα δεσμεύουν τη γαλακτοσιδηρίνη και έτσι ο σίδηρος παραμένει διαθέσιμος για τα βακτήρια (Reiter 1985, Oliver & Sordillo 1989). Κατά τη διαδικασία της παλινδρόμησης του μαστικού αδένος η συγκέντρωση κιτρικών ιόντων μειώνεται, ενώ αυτή της γαλακτοσιδηρίνης αυξάνεται, οπότε και είναι η περίοδος της πιο αποτελεσματικής δράσης της. Αντίθετα, αμέσως μετά τον τοκετό η συγκέντρωση κιτρικών ιόντων είναι αυξημένη, ενώ αυτή της γαλακτοσιδηρίνης μικρή, οπότε και ο μαστικός αδένος είναι πιο ευάλωτος σε λοιμώξεις. Επιπλέον, θεωρείται ότι η γαλακτοσιδηρίνη ενεργοποιεί το συμπλήρωμα και προάγει τη φαγοκυττάρωση, καθώς και τη θανάτωση των βακτηρίων από τα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα (Reiter 1985, Oliver και Sordillo 1989, Chew, Michal, Wong & Heirman 1991).

Σύστημα γαλακτοπεροξειδάσης / θειοκυανικών ιόντων / υπεροξειδίου του υδρογόνου

Το σύστημα γαλακτοπεροξειδάσης / θειοκυανικών ιόντων / υπεροξειδίου του υδρογόνου, το οποίο βρίσκεται στο μαστικό έκκριμα και το σάλιο, βασίζεται στο ένζυμο της γαλακτοπεροξειδάσης. Η αντιβακτηριακή δραστηριότητα αυτού του συστήματος οφείλεται στην παραγωγή οξειδωτικών παραγόντων, οι οποίοι επιδρούν ανασταλτικά στον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων μέσω της δράσης τους στις εσωτερικές μεμβράνες τους (Bjorck 1985, Reiter 1985). Η γαλακτοπεροξειδάση βρίσκεται συνεχώς στο μαστικό αδένος των αγελάδων, πιθανόν παραγόμενη από τα μαστικά επιθηλιακά κύτταρα, ενώ η ποσότητα θειοκυανικών ιόντων εξαρτάται από την καταναλισκόμενη τροφή (Bjorck 1985, Reiter 1985). Όταν η τροφή περιέχει μεγάλη ποσότητα γλυκοσυνολοειδών ουσιών, αυξάνεται και η συγκέντρωση θειοκυανικών ιόντων στο μαστικό έκκριμα.

Όμως, φαίνεται ότι το υπεροξείδιο του υδρογόνου είναι ο περιοριστικός παράγοντας του συστήματος αυτού. Βακτήρια, τα οποία δεν παράγουν καταλάση (π.χ. Στρεπτόκοκκοι), παράγουν H_2O_2 , και έτσι επηρεάζονται από το σύστημα, ενώ βακτήρια τα οποία παράγουν καταλάση (π.χ. Σταφυλόκοκκοι, *E. coli*), μπορούν να επηρεαστούν μόνον εφόσον εξωγενές H_2O_2 δημιουργηθεί στο μαστικό αδένος από ένζυμα, όπως η οξειδάση της γλυκόζης ή η οξειδάση της ξανθίνης (Bjorck 1985, Reiter 1985). Σημειώνεται ότι στο θηλαίο κόλπο και το μαστικό παρέγχυμα των αγελάδων έχει ανιχνευθεί οξειδάση της ξανθίνης (Collins, Parsons, Field & Bramley 1988), οπότε επιβεβαιώνεται η δυνατότητα δράσης των συστημάτων.

Λυσοζύμη

Σε *in vitro* μελέτες βρέθηκε ότι η λυσοζύμη υδρόλυε την πεπτιδογλυκάνη του βακτηριακού τοιχώματος (Banks & Tranter 1985, Reiter 1985), ασκώντας έτσι αντιβακτηριακή δραστηριότητα σε Gram-θετικά και Gram-αρνητικά βακτήρια (Vakil, Chandan, Parry & Shahani, 1969). Όμως, κάποιοι από τους παθογόνους μικροοργανισμούς δεν προσβάλλονται, λόγω του αδιαπέραστου κυτταρικού τοιχώματός τους. Αυτό μπορεί να λυθεί, όταν συνεργαστεί η λυσοζύμη με τα αντισώματα ή το συμπλήρωμα και οψωνοποιηθούν τα βακτήρια (Banks & Tranter 1985, Reiter 1985). Επιπλέον, η λυσοζύμη προωθεί τη φαγοκυττάρωση των βακτηρίων, παρεμποδίζει την προσκόλλησή τους στα μαστικά επιθηλιακά κύτταρα και έχει ανοσορρυθμιστικές ιδιότητες (Banks & Tranter 1985, Reiter 1985).

Πάντως άλλοι ερευνητές αμφισβητούν τη σημασία της, καθώς βρέθηκαν μικρές ή ελάχιστες συγκεντρώσεις της στο μαστικό έκκριμα (Shahani, Herper, Jensen, Parry & Zittle 1973). Επιπλέον, η αποτελεσματικότητά της δεν έχει επιβεβαιωθεί σε *in vivo* μελέτες, αν και βρέθηκε ότι η συγκέντρωσή της ήταν αυξημένη στην αρχή και το τέλος της γαλακτικής περιόδου, καθώς και σε περιπτώσεις μαστίτιδας (Shahani και συν. 1973, Gotze, Meyer & Buschmann 1977, Lie, Syed & Solbu 1986, Carlsson και συν. 1989).

Η πηγή προέλευσης της λυσοζύμης στο μαστικό έκκριμα δεν είναι γνωστή. Πολλές υποθέσεις έχουν γίνει, όπως η διάχυσή της από το αίμα, η απελευθέρωσή της από τα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα ή, τέλος, η τοπική παραγωγή της από το μαστικό επιθήλιο (Gordon, Todd & Cohn 1974, Reiter 1985).

Δ. ΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ *MANNHEIMIA HAEMOLYTICA*

Ταξινόμηση

Το γένος *Mannheimia* ανήκει στην οικογένεια *Pasteurellaceae* και περιλαμβάνει τα είδη *M. glucosida*, *M. granulomatis*, *M. haemolytica*, *M. uminalis*, *M. varigena*. Από αυτά, το σημαντικότερο για την κτηνιατρική είναι το είδος *M. haemolytica*. Η δημιουργία του γένους προτάθηκε το 1999, προκειμένου να συμπεριλάβει στελέχη της παλαιάς ομάδας *Pasteurella haemolytica*, τα οποία δε ζύμωναν την τρεαλόζη.

Το βακτήριο περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1885 από τον Kitt ως *Bacterium bipolare multacidum*. Το 1932, οι Newsom και Cross δημιούργησαν το είδος *Pasteurella haemolytica*, για να συμπεριλάβει στελέχη του μετονομασθέντος βακτηρίου από βοοειδή και πρόβατα. Στη συνέχεια, διακρίθηκαν δύο βιότυποι στο είδος αυτό: ο βιότυπος Α, ο οποίος περιελάμβανε στελέχη που ζύμωναν την αραβινόση αλλά όχι την τρεαλόση, και ο βιότυπος Τ, ο οποίος περιελάμβανε στελέχη που ζύμωναν την τρεαλόση αλλά όχι την αραβινόση (Euzeby 2005). Πάντως, μεταξύ των στελεχών των δύο βιοτύπων, υπήρχαν και άλλες διαφορές (Smith 1964, Frederiksen 1973). Επιπλέον, ο Frederiksen (1973) πρότεινε τη δημιουργία ενός τρίτου βιοτύπου, ο οποίος ονομάστηκε "τρίτη ταξινομική ομάδα κατά Frederiksen" και περιελάμβανε στελέχη, τα οποία δεν ανήκαν σε κανέναν από τους άλλους δύο βιοτύπους. Σήμερα τα στελέχη του βιοτύπου Τ του παλαιού είδους *P. haemolytica* περιλαμβάνονται στο γένος *P. trehalosi* (Sneath & Stevens 1990).

Οι Biberstein, Gills και Knight (1960) χρησιμοποίησαν τη δοκιμή της αιμοσυγκόλλησης και ταυτοποίησαν 17 συνολικά οροτύπους στο είδος *P. haemolytica*. Οι ορότυποι 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 14, 16 και 17 ανήκαν στο βιότυπο Α, οι ορότυποι 3, 4, 10 και 15 ανήκαν στο βιότυπο Τ και ο ορότυπος 11 ανήκε στο βιότυπο "τρίτη ταξινομική ομάδα κατά Frederiksen".

Οι Angen, Aalbaek, Falsen, Olsen και Bisgaard (1997), οι Angen, Caugant, Olsen και Bisgaard (1997) και οι Angen, Mutters, Caugant, Olsen και Bisgaard (1999) μελέτησαν τις λεπτομέρειες στελεχών του οροτύπου Α και του οροτύπου "τρίτη ταξινομική ομάδα κατά Frederiksen", χρησιμοποιώντας ηλεκτροφορητική ανάλυση των ισοενζύμων, ριβοτύπηση, μελέτη της αλληλουχίας του DNA-R16S και μελέτη υβριδοποίησης DNA-DNA, απέδειξαν δε ότι όλα αυτά τα στελέχη μπορούσαν να ταξινομηθούν σε ένα καινούριο γένος που θα περιελάμβανε

περισσότερα είδη. Στη συνέχεια, οι Angen, Olsen και Bisgaard (1999) πρότειναν τη δημιουργία του γένους *Mannheimia* με στελέχη μόνον ενός οροτύπου και πέντε βακτηριακά είδη.

Το είδος *M. haemolytica* περιλαμβάνει βακίλλους, αρνητικούς κατά Gram, ακίνητους, μη σπορογόνους, διαστάσεων 0,2 X 1-2 μm, που αναπτύσσονται σε αερόβιο ή μικροαερόφιλο περιβάλλον, συνήθως οξειδάση θετικού, καταλάση θετικού, που ζυμώνουν τη γλυκόζη χωρίς παραγωγή αερίων και δεν απαιτούν την παραγωγή του παράγοντα V για την ανάπτυξή τους (Euzeby 2005).

Το βακτήριο είναι θετικό για την αναγωγή των νιτρωδών, την παραγωγή αλκαλικής φωσφατάσης, τη ζύμωση της D-φρουκτόζης, της D-μαννιτόλης και της σακχαρόζης. Αντίθετα, η δοκιμή κιτρικών κατά Simmons, η ανάπτυξη σε ζωμό KCN, η δοκιμή VP, η παραγωγή H₂S, η παραγωγή ουρεάσης, η παραγωγή ADH, η παραγωγή LDC, η παραγωγή ινδόλης, απαμινάσης της φαινυλαλανίνης, ζελατινάσης, η υδρόλυση του Tween 20 και του Tween 80, η ζύμωση της αδονιτόλης, της D-αραβιτόλης, της δουλσιτόλης, της meso-ερυθριτόλης, της D-φουκόζης, της α-μεθυλ-D-γλυκοπιρανοσίδης, του D-γλυκογόνου, της ινουλίνης, της D-μανόζης, της D-μελεζιτόλης, της L-σορβιτόλης, της τρεαλόζης, της D-τουρανόζης, της ξυλιτόλης και της L-ξυλόλης, η δράση της ουρεάσης και της δεκαρβοξυλάσης της ορνιθίνης είναι αρνητικές (Euzeby 2005). Σε αιματούχο άγαρ, μετά από 24 ώρες αερόβιας επώασης σε θερμοκρασία 37 °C, οι αποικίες είναι λείες, άοσμες, γκριζωπές με διάμετρο 1 έως 2 mm, εμφανίζουν δε β-αιμόλυση. Σε άγαρ MacConkey το βακτήριο εμφανίζει αποικίες κόκκινου χρώματος μεγέθους κεφαλής καρφίτσας. Σημειώνεται ότι σε δείγματα από ιστούς, το βακτήριο εμφανίζει διπλοκική χρώση (Euzeby 2005).

Η ύπαρξη σιδήρου στο περιβάλλον είναι απαραίτητη για την πλήρη ανάπτυξη του βακτηρίου. Ο σίδηρος προσλαμβάνεται από χηλικές ενώσεις τρανσφερίνης-σιδήρου, οι οποίες προσκολλώνται στην επιφάνεια του μικροοργανισμού.

Οικολογία και παθογόνος δράση

Το βακτήριο είναι παράσιτο των μηρυκαστικών και συνήθως δεν βρίσκεται στο εξωτερικό περιβάλλον, εκτός και αν αυτό επιμολύνεται από ένα ζώο, που απεκκρίνει το μικρόβιο. Σε πειραματικές μελέτες έχει βρεθεί ότι το βακτήριο επιβιώνει σε θερμοκρασία 20 °C επί 1 ώρα σε ξύλινους πάγκους και επί 24 ώρες σε κατεργασμένο δέρμα. Καθώς η υγρασία αυξάνεται και η θερμοκρασία μειώνεται, αυξάνεται η διάρκεια επιβίωσης του βακτηρίου, η οποία μπορεί να φτάσει έως 48 ώρες σε κατεργασμένο δέρμα σε θερμοκρασία 4 °C, 3 ημέρες σε γάλα ή νερό σε

θερμοκρασία 20 °C, 7 ημέρες σε νερό σε 4 °C και 8 ημέρες σε γάλα σε 4 °C (Bisgaard 1993, Frederiksen 1993).

Το βακτήριο απομονώνεται κυρίως από βοοειδή και μικρά μηρυκαστικά και υπάρχει ως φυσιολογική βακτηριακή χλωρίδα στην ανώτερη αναπνευστική οδό και στη στοματική κοιλότητα. Τα κυριότερα νοσολογικά σύνδρομα που προκαλεί είναι στα μεν βοοειδή πνευμονία, στα δε μικρά μηρυκαστικά σηψαιμία, πνευμονία και μαστίτιδα.

Λοιμογόνοι παράγοντες

Ινίδια

Τα στελέχη *M. haemolytica* έχουν δύο τύπους ινιδίων. Ο ένας περιλαμβάνει άκαμπτα ινίδια μήκους 12 nm και ο δεύτερος εύκαμπτα ινίδια μήκους 5 nm. Πιθανολογείται ότι ο ρόλος τους είναι να υποβοηθούν την προσκόλληση και τη μετακίνηση του βακτηρίου. Η έκφραση των ινιδίων είναι εντονότερη, όταν ο μικροοργανισμός αποικιοποιεί ένα βλεννογόνο, αλλά μειώνεται μετά την είσοδο του βακτηρίου στο ζώο, ώστε να αποφευχθεί η προσκόλλησή του στα φαγοκύτταρα (Potter, Ready & Gilchrist 1988, Morck, Olson, Acres, Daoust & Costerton 1989).

Βακτηριακή κάψα

Η βακτηριακή κάψα (έλυτρο) έχει βρεθεί σε όλα τα στελέχη του μικροοργανισμού, που έχουν απομονωθεί από τραχεία, βρόγχους και πνευμονικές κυψελίδες ζώων, αποτελείται από πολυσακχαρίτες και σε *in vitro* μελέτες έχει βρεθεί ότι αναπτύσσεται κατά τη φάση της λογαριθμικής ανάπτυξης των βακτηρίων (Gatewood και συν. 1994). Η ανθεκτικότητα της βακτηριακής κάψας είναι ανάλογη με την ποσότητα του διαθέσιμου σιδήρου στο περιβάλλον. Η κάψα επιτρέπει την προσκόλληση του βακτηρίου στα επιθηλιακά κύτταρα και, αν και αποτελεί παράγοντα χημειοτακτισμού για τα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα, προστατεύει τους μικροοργανισμούς από εξουδετέρωσή τους από τα λευκοκύτταρα (μέσω της μείωσης της φαγοκυττάρωσης και της ανθεκτικότητας στην ενδοκυτταρική θανάτωση) και τους παρέχει προστασία από το σύστημα του συμπληρώματος (Confer, Panciera, Clinkenbeard & Mosier 1990). Σε πειραματικές μελέτες έχει βρεθεί ότι αντισώματα κατά της βακτηριακής κάψας προστατεύουν τα ζώα από την παθογόνο δράση του μικροοργανισμού (Romalde & Magarinos 1997).

Λιποπολυσακχαρίτης

Ο λιποπολυσακχαρίτης είναι συστατικό της κυτταρικής μεμβράνης του βακτηρίου (Squire, Smiley & Croskell 1984), με δράση ανάλογη αυτής των λιποπολυσακχαριτών των άλλων αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Η ενδοφλέβια έγχυση λιποπολυσακχαρίτη *M. haemolytica* προκαλεί την απελευθέρωση θρομβοξάνης A_2 , προσταγλανδινών, σεροτονίνης, AMPc και GMPc (Paulsen, Confer, Clinkenbeard & Mosier 1990). Αυτοί οι ενδιάμεσοι παράγοντες φλεγμονής είναι εν μέρει υπεύθυνοι για τα κλινικά συμπτώματα που παρατηρούνται, καθώς και για την ενδοτοξίνωση, σε περιπτώσεις μόλυνσης από *M. haemolytica* (Zecchinon, Fett & Desmecht 2005).

Ο λιποπολυσακχαρίτης προκαλεί φλεγμονή και συνακόλουθα λευκοκυτταρική διήθηση, λόγω της χημειοτακτικής δράσης της κυτοκίνης IL-8, μέσω της ενεργοποίησης της εναλλακτικής οδού του συμπληρώματος, της ενεργοποίησης της σύνθεσης κυτοκινών (IL-1 β , IL-8, TNF- α) και της ενεργοποίησης της σύνθεσης μεταβολιτών του αραχιδονικού οξέος από τα μακροφάγα (Maheswaran, Weiss, Kannan, Townsend, Reddy, Whiteley & Srikumaran 1992, Sharma, Olchoway, Yang & Breider 1992). Πιστεύεται ότι μετά την προσκόλληση του βακτηρίου στις ανώτερες αναπνευστικές οδούς, ο λιποπολυσακχαρίτης διαχέεται στις κυτταρικές μεμβράνες ενεργοποιώντας το σύστημα του συμπληρώματος στο επίπεδο των πνευμονικών κυψελίδων, με αποτέλεσμα τη μετανάστευση ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων, το σχηματισμό οίδημάτων, την εξαγγείωση και την αιμορραγία (Confer 1993). Επιπλέον, θεωρείται ότι ο λιποπολυσακχαρίτης έχει κυτταροτοξική δράση κατά των λευκοκυττάρων (Confer & Simmons 1986) και κατά των κυττάρων του ενδοθηλίου των αγγείων. Έτσι εξηγούνται οι αιμορραγικές αλλοιώσεις, η νέκρωση και η εξίδρωση σε ιστούς που προσβάλλονται από *M. haemolytica* (Paulsen, Mosier, Clinkenbeard & Confer 1989, Breider, Kumar & Corstvet 1990).

Πρωτεΐνες και λιποπρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης

Πολλές πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης του βακτηρίου με μοριακό βάρος (MB) 10 έως 35 kDa παίζουν ρόλο στην προστασία του από τα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα, μέσω της αναστολής της φαγοκυττάρωσης και της ενδοκυτταρικής θανάτωσης (Lainson, Harkins, Wilson, Sutherland, Murray, Donachie & Baird 1991, Davies, Parton, Coote, Gibbs & Freer 1992, Davies, McCluskey, Gibbs, Coote, Freer & Parton 1994). Επιπλέον, τέσσερις λιποπρωτεΐνες (MB = 29-30 kDa συμμετέχουν στην προστασία του βακτηρίου από τις συνέπειες της

ενεργοποίησης της κλασσικής οδού του συστήματος του συμπληρώματος (Craven, Confer & Gentry 1991, Davies και συν. 1992, Davies και συν. 1994, Nardini, Mellors & Lo 1998).

Επίσης, έχουν ανιχνευτεί δύο πρωτεΐνες στην εξωτερική μεμβράνη, η PomA (MB = 32 kDa) και η PomB (MB = 35 kDa) (Pandher & Murphy 1996, Jaramillo, Zenteno & Trigo 1999). Η πρωτεΐνη PomA είναι μία πορίνη, ρόλος της οποίας είναι η διατήρηση της εξωτερικής κυτταρικής μεμβράνης του βακτηρίου, αν και η ακριβής λοιμογόνος δράση της δεν είναι γνωστή.

Συστήματα δέσμευσης σιδήρου

Η *M. haemolytica* διαθέτει συστήματα δέσμευσης του σιδήρου του περιβάλλοντος, στο οποίο αναπτύσσεται. Όταν το βακτήριο καλλιεργείται σε υποστρώματα με μειωμένη συγκέντρωση σιδήρου, συνθέτει δύο πρωτεΐνες, οι οποίες δεσμεύουν με ειδικό τρόπο την τρανσφερίνη των μηρυκαστικών (Deneer & Potter 1989, Morck, Ellis, Domingue, Olson & Costerton 1991). Το γονίδιο *tbpA* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη TbpA (MB = 100 kDa) και το γονίδιο *tbpB* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη TbpB (MB = 71 kDa) (Potter, Schryvers, Ogunnariwo, Hutchins, Lo & Watts 1999).

Λευκοτοξίνη

Η *M. haemolytica* παράγει μια τοξίνη με κυτταροτοξική δράση (Himmel, Yates, Lauerman & Squire 1982), η οποία είναι μία πλούσια σε γλυκίνη πρωτεΐνη (MB = 104 kDa). Η τοξίνη ανήκει στην οικογένεια RTX ("Repeats in the structure ToXin"), με έξι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, και αποτελείται από 953 αμινοξέα (Forestier & Welch 1991, Welch, Forestier, Lobo, Pellett, Thomas & Rowe 1992). Η τοξίνη δρα εισερχόμενη στις κυτταρικές μεμβράνες και σχηματίζει πόρους διαμέτρου 0,9 έως 1,2 nm, επιπλέον δε προκαλεί το θάνατο των προσβαλλόμενων κυτάρων μέσω της πρόωρης απόπτωσής τους (Stevens & Czuprynski 1996).

Το φάσμα δράσης της λευκοτοξίνης της *M. haemolytica* είναι πολύ στενό (Zecchinon και συν. 2005), καθώς αυτή είναι δραστική μόνον κατά των λευκοκυττάρων και των αιμοπεταλίων των μηρυκαστικών (Bowersock, Walker, Maddux, Fenner & Moore 1990, Rashid, Weiss, Maheswaran & Murtaugh 1996, O'Brien & Duffus 1997). Αυτή η ειδική δράση μπορεί να εξηγηθεί μάλλον μέσω της προσκόλλησής της σε έναν υποδοχέα, που υπάρχει μόνο σε ορισμένα κύτταρα των μηρυκαστικών. Στα βοοειδή ο υποδοχέας αυτός είναι το μόριο CD18, η δε τοξίνη δεσμεύεται σε ένα πεδίο του μορίου και συγκεκριμένα, στη β-υπομονάδα (Shuster,

Bosworth & Kehrli 1992, Shuster, Kehrli, Ackermann, Gilbert 1992), το οποίο είτε δεν υπάρχει, είτε είναι διαφορετικό στα άλλα ζωικά είδη (Jeyaseelan, Kannan, Briggs, Thumbikat & Maheswaran 2001, Zecchinon και συν. 2005).

Σε μικρές συγκεντρώσεις η τοξίνη μειώνει τη φαγοκυττάρωση, υποβοηθά την απελευθέρωση των κυτταροπλασματικών κοκκίων και των ριζών οξυγόνου από τα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα και μειώνει το ρυθμό πολλαπλασιασμού των λευκοκυττάρων. Σε μεγαλύτερη συγκέντρωση έχει κυτταροτοξική δράση για τα λευκοκύτταρα (Berggren, Baluyut, Simonson, Bemrick & Maheswaran 1981, Thumbikat, Briggs, Kannan & Maheswaran 2003). Τα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα, τα οποία κυρίως προσβάλλονται από την τοξίνη, ξεκινούν μια διαδικασία φλεγμονής, μέσω της έκλυσης ριζών οξυγόνου, εικοσανοειδών, ισταμίνης και πρωτεολυτικών ενζύμων (Czurzynski, Noel, Carranza & Srikumaran 1991). Επίσης, τα μακροφάγα υπό τη δράση της τοξίνης συνθέτουν TNF- α και IL-1 β (Lafleur, Abrahamsen & Maheswaran 1998). Τα ένζυμα που παράγονται μετά την λύση των λευκοκυττάρων υπό τη δράση της λευκοτοξίνης, καθώς και η ίδια η λευκοτοξίνη, προκαλούν τη μετανάστευση περισσότερων λευκοκυττάρων και την αύξηση της βαρύτητας των αλλοιώσεων.

Επιπλέον, η καταστροφή των αιμοπεταλίων προκαλεί φλεβική θρόμβωση και εξίδρωση ινικής. Σε πειραματικές μελέτες έχει βρεθεί ότι η λευκοτοξίνη μπορεί να προκαλέσει αλλοιώσεις στους πνεύμονες με εστίες ηπάτωσης, οιδήματα και αιμορραγία. Επιπλέον, η λευκοτοξίνη προσκολλάται στη μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων, παρουσιάζοντας σαφή αιμολυτική δράση. Τέλος, προκαλεί την απορρύθμιση του συστήματος MHC II στην επιφάνεια των μακροφάγων, επηρεάζοντας έτσι την ικανότητα αυτών των κυττάρων να παρουσιάζουν το αντιγόνο (Ingh, Visser, Henricks & Binkhorst 1990, Stevens & Czurzynski 1996, Lafleur, Malazdrewich, Jeyaseelan, Bleifield, Abrahamsen & Maheswaran 2001).

Εξωκυτταρικά ένζυμα

Το βακτήριο παράγει τέσσερα ένζυμα, τα οποία είναι υπεύθυνα για τη διευκόλυνση της αποικιοποίησης των ιστών του ζώου ή για τη μείωση των αμυντικών μηχανισμών του. Η Ο-σιαλογλυκοπρωτεΐνη ενδοπεπτιδάση είναι μια μεταλλοπρωτεΐνάση (MB = 35,2 kDa), η οποία βρίσκεται σε όλα τα στελέχη *M. haemolytica*. Ο ακριβής της ρόλος δεν είναι γνωστός, αλλά φαίνεται ότι διευκολύνει την προσκόλληση του βακτηρίου στους ιστούς των ζώων (Lo, McKerrall, Hills & Kostrzynska 2001). Η νευραμινιδάση (MB = 160 kDa) παράγεται από όλα τα στελέχη κατά τη φάση στασιμότητας, με ρόλο την υποβοήθηση της προσκόλλησης στους βλεννογόνους (Straus, Purdy, Loan, Briggs & Frank 1998). Η δισμουτάση του υπεροξειδίου παίζει ρόλο στην

καταστροφή των ριζών υπεροξειδίου και προστατεύει το βακτήριο από τις ρίζες οξυγόνου που παράγονται από τα λευκοκύτταρα (Lainson, Thomson, Rowe, Langford, Aitchison, Donachie & Kroll 1996). Τέλος, μια IgG₁ πρωτεΐνωση έχει ανιχνευθεί σε *in vivo* πειραματισμούς, αλλά η φύση και ο ρόλος της είναι ακόμα άγνωστες (Pandher, Murphy & Confer 1999).

Παθογόνος δράση για τα πρόβατα

Η *M. haemolytica* υπάρχει ως φυσιολογική βακτηριακή χλωρίδα στην ανώτερη αναπνευστική οδό και στη στοματική κοιλότητα των προβάτων. Η μόλυνση των νεογέννητων αμνών γίνεται τις πρώτες ημέρες μετά τη γέννησή τους, κατά την επαφή με τη μητέρα τους.

Αναπνευστικά σύνδρομα

Η πνευμονική παστεριδίωση που προκαλείται από *M. haemolytica* είναι συχνή βακτηριακή νόσος των προβάτων. Η ασθένεια περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1931.

Σε κάποια περιστατικά δεν παρατηρούνται κλινικά συμπτώματα και το ζώο βρίσκεται νεκρό, στην πλειονότητα όμως των περιπτώσεων βρίσκονται πυρετός, αναπνευστικά συμπτώματα και ρινικό / οφθαλμικό έκκριμα. Σε υποξεία ή χρόνια περιστατικά τα συμπτώματα είναι ηπιότερα. Τα παθολογοανατομικά ευρήματα περιλαμβάνουν διόγκωση των πνευμόνων, οι οποίοι έχουν έντονα ερυθρωπές, ηπατωμένες περιοχές και, όταν τέμνονται, αναβλύζουν αφρώδες αιμορραγικό υγρό, συχνά με ταυτόχρονη ύπαρξη αλλοιώσεων πλευρίτιδας. Στις υποξείες καταστάσεις είναι χαρακτηριστική η ηπάτωση των πρόσθιων λοβών. Σε πολλά περιστατικά παρατηρούνται επίσης οργανοποιημένες συμφύσεις (Frank 1989, Gilmour & Gilmour 1989, Shewen & Conlon 1993, Brogden, Lehmkuhl & Cutlip 1998).

Θεωρείται ότι διάφοροι παράγοντες προδιαθέτουν τα ζώα σε αναπνευστική προσβολή από *M. haemolytica*, όπως για παράδειγμα, ο υγρός ή κρύος καιρός, η αυξημένη συγκέντρωση ζώων στο στάβλο, η καταπόνησή τους μέσω διαφόρων χειρισμών (ευνουχισμοί, πραγματοποίηση εμβολιασμών, χορήγηση αντιπαρασιτικών) και η προϋπάρχουσα λοίμωξη από άλλα μικρόβια (ιός πνευμονικής αδενομάτωσης, ιός προϊούσας πνευμονίας, ιός παραγρίπτης τύπος III, *M. ovipneumoniae*, *Bordetella parapertusis*) (Gilmour & Gilmour 1989, Donachie 2001).

Μαστίτιδα

Η βιβλιογραφία η σχετική με τη μαστίτιδα από *M. haemolytica* ανασκοπήθηκε παραπάνω (Τμήμα Β).

Δειγματοληψία - Ταυτοποίηση

Σε περιπτώσεις αναπνευστικής μόλυνσης συνιστάται η καλλιέργεια βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος ή υγρού περιεχομένου της τραχείας των ασθενών ζώων. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων της καλλιέργειας δειγμάτων ρινικού εκκρίματος είναι δύσκολη, δεδομένου ότι το βακτήριο μπορεί να υπάρχει στις ρινικές κοιλότητες υγιών ζώων. Σε νεκρά ζώα λαμβάνονται δείγματα από πνεύμονες με αλλοιώσεις. Σε περιπτώσεις μαστίτιδας λαμβάνεται δείγμα μαστικού εκκρίματος για καλλιέργεια.

Τα δείγματα καλλιεργούνται σε υποστρώματα αρχικής καλλιέργειας, όπως Columbia άγαρ ή άγαρ τρυπτόζης, με 5% αίμα προβάτου ή βοοειδούς ή με 10% ορό ίππου. Εφόσον υπάρχει υποψία επιμόλυνσεων των δειγμάτων, μπορεί να προστεθεί καναμικίνη στα παραπάνω υποστρώματα, ώστε να ανασταλεί η ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών (Barrow & Feltham 1993).

Για την ανάπτυξη των βακτηρίων αρκεί η επώαση των υποστρωμάτων σε αερόβιο περιβάλλον. Μετά από επώαση 24 ωρών οι αποικίες του βακτηρίου είναι κυκλικές και έχουν ύψος 1 έως 2 mm. Μετά την εφαρμογή των προκαταρκτικών βασικών βακτηριολογικών εξετάσεων (χρώση Gram, δοκιμή καταλάσης, δοκιμή οξειδάσης κ.λπ.) μπορεί χρησιμοποιηθούν είτε οι ταχείες βακτηριολογικές διαγνωστικές δοκιμές (API 20NE), καθώς είναι ακριβείς για την ταυτοποίηση του συγκεκριμένου είδους διευκολύνοντας έτσι την ταυτοποίησή του, είτε σειρές με τις κλασσικές ειδικές βιοχημικές δοκιμές (Barrow & Feltham 1993).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ II

ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΚΑ ΚΑΙ ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ
ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΣΕ ΘΗΛΕΣ ΚΛΙΝΙΚΑ ΥΓΙΩΝ
ΠΡΟΒΑΤΩΝ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στις μελέτες παθογένειας των νοσημάτων μικροβιακής αιτιολογίας είναι απαραίτητη η διερεύνηση της οικολογίας των μικροοργανισμών στο περιβάλλον του ξενιστή και στο σώμα του ζώου. Για παράδειγμα, για τη μελέτη της τερηδόνας απαιτείται η διερεύνηση της οικολογίας των μικροοργανισμών στη στοματική κοιλότητα, για τη μελέτη της ποδοδερματίτιδας απαιτείται η διερεύνηση της οικολογίας των βακτηρίων στη χηλή των προβάτων και στους λειμώνες όπου βόσκουν αυτά, ενώ, τέλος, για τη μελέτη της δερματοφίλωσης (μόλυνση από *Dermatophilus congolensis*) απαιτείται η διερεύνηση της μικροβιακής οικολογίας στο δέρμα των προβάτων.

Τα αποτελέσματα παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με το περιβάλλον των βακτηρίων, τη βακτηριακή χλωρίδα της προσβεβλημένης περιοχής του σώματος, τις προσωρινές μεταβολές του είδους και του αριθμού των μικροοργανισμών ανάλογα με τις συνθήκες εκτροφής, καθώς επίσης και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μικροοργανισμών.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο I, Τμήμα Β & Τμήμα Γ), στη μεγάλη πλειονότητα των περιπτώσεων, τα βακτήρια εισέρχονται στο μαστικό αδένα μέσω της θηλής του. Η μόλυνση εξαρτάται από την ικανότητα των μικροβίων να επιζήσουν στο περιβάλλον των ζώων, από την ποσότητα των μικροβίων στο περιβάλλον των ζώων (περιλαμβάνονται και ήδη μολυσμένοι μαστικοί αδένες), από την έκθεση των ζώων στους παθογόνους μικροοργανισμούς και από την ευαισθησία των ζώων στα εισβάλλοντα βακτήρια.

Οι πιο σημαντικοί αιτιολογικοί παράγοντες της ασθένειας (Σταφυλόκοκκοι και *Mannheimia haemolytica*) αποτελούν συνολικά το 80% των βακτηριακών στελεχών που απομονώνονται από περιστατικά μαστίτιδας (Bergonier & Berthelot 2003). Η επιδημιολογία αυτών των μικροοργανισμών δεν έχει μελετηθεί πλήρως, αν και υπάρχουν διάφορες θεωρίες όσον αφορά στην προέλευσή τους.

Για παράδειγμα, *M. haemolytica* υπάρχει ως φυσιολογική βακτηριακή χλωρίδα, στην ανώτερη αναπνευστική οδό και στη στοματική κοιλότητα των προβάτων. Πιστεύεται ότι κατά τη διάρκεια του θηλασμού πιθανόν μεταφέρεται από τη στοματική κοιλότητα των αμνών στις θηλές των προβάτων και στη συνέχεια, στους μαστικούς αδένες (Gunning & Davies 1989, Scott & Jones 1998).

Όσον αφορά στους Σταφυλόκοκκους, θεωρείται ότι αυτοί προέρχονται από τα χέρια των αρμεκτών ή από το δέρμα της θηλής (Marco Melero 1994, Ziluga, Romeo & Marco 1998, Bergonier & Berthelot 2003). Άλλωστε, η μαστίτιδα σταφυλοκοκκικής αιτιολογίας έχει συσχετισθεί με στελέχη των μικροοργανισμών, τα οποία απομονώνονται από το δέρμα του

μαστού ή των θηλών ζώων (Scott & Murphy 1997). Σε μελέτες που έχουν γίνει σε αγελάδες έχει επιβεβαιωθεί ότι η διαδικασία της άρμεξης συμβάλλει στην είσοδο μικροοργανισμών στο μαστικό αδέν. Αν και ανάλογες μελέτες δεν υπάρχουν στις προβατίνες, οι Ziluga και συν. (1998) ανέφεραν ότι σημαντικός παράγοντας μετάδοσης των Σταφυλόκοκκων αποτελούν οι αρμεκτικές μηχανές (π.χ. λόγω ανεπαρκούς απολύμανσης των θηλάστρων ή λόγω υπερβολικά χρησιμοποιούμενων θηλάστρων), καθώς και τα χέρια των αρμεκτών.

Σημειώνεται πάντως ότι η έλλειψη ειδικών τεχνικών για τη δειγματοληψία υλικού από το θηλαίο πόρο έχει συντελέσει στην απουσία ολοκληρωμένων μελετών για την οικολογία των βακτηρίων και τη δυναμική της μόλυνσης στη θηλή των προβάτων.

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται τα ευρήματα που αφορούν στα παρακάτω.

- α. Στην περιγραφή και την αξιολόγηση μιας νέας τεχνικής για λήψη υλικού από το θηλαίο πόρο των προβάτων (Τμήμα Β).
- β. Στα βακτηριακά ευρήματα σε θηλές κλινικά υγιών προβάτων, σε όλη τη διάρκεια μίας γαλακτικής περιόδου τους, καθώς και οι επιπτώσεις της διαδικασίας άρμεξης στα ευρήματα αυτά (Τμήμα Γ).
- iii. Στα ιστοπαθολογικά ευρήματα σε θηλές κλινικά υγιών προβάτων, με έμφαση στην παρουσία λεμφικού ιστού (Τμήμα Δ).

Β. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΙΑΣ ΝΕΑΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΓΙΑ ΛΗΨΗ ΥΛΙΚΟΥ ΑΠΟ ΤΟ ΘΗΛΑΙΟ ΠΟΡΟ ΠΡΟΒΑΤΩΝ

Υλικά και μέθοδοι

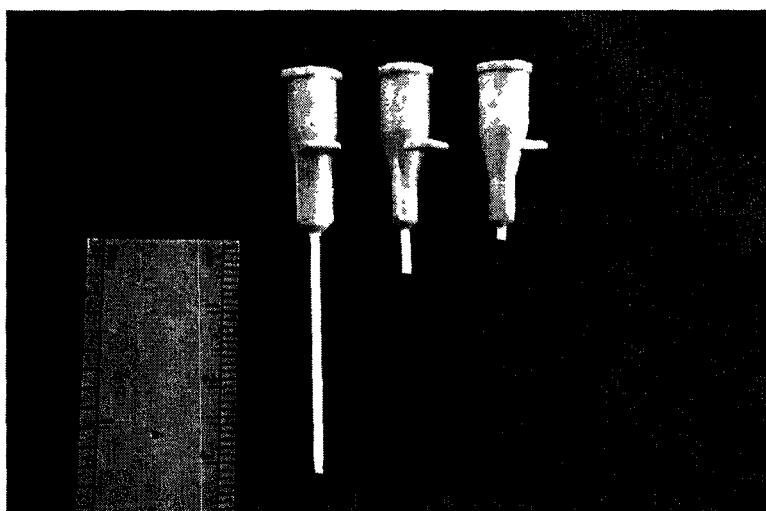
Περιγραφή της τεχνικής

Η τεχνική συνίσταται στη χρησιμοποίηση στείρου, λεπτού, πλαστικού καθετήρα 20 G (Abbotath[®]-Abbott Laboratories Inc., Abbott Park, ΗΠΑ), ο οποίος εισάγεται στο θηλαίο πόρο της υπό εξέταση προβατίνας.

Πριν την εισαγωγή του καθετήρα, αφαιρείται ο μεταλλικός οδηγός - βελόνα και, στη συνέχεια, ο πλαστικός καθετήρας κόβεται με στείρα λεπίδα χειρουργικού νυστεριού σε μήκος 2 mm. Για τον ακριβή προσδιορισμό του σημείου τομής, χρησιμοποιείται πάντοτε αποστειρωμένος μεταλλικός χάρακας, που τοποθετείται ακριβώς δίπλα στον καθετήρα. Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται επάνω σε αποστειρωμένη χειρουργική οθόνη, ο δε χειριστής φορά χειρουργικά γάντια (Εικόνα II.1).

Στη συνέχεια γίνεται η δειγματοληψία. Με την προβατίνα συγκρατούμενη σε όρθια θέση, γίνεται 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 συγκρατείται από το ανώτερο ευρύ πλαστικό στόμιό του και εισάγεται στο θηλαίο πόρο, στο εσωτερικό τοίχωμα του οποίου περιστρέφεται, και στη συνέχεια αφαιρείται. Το υλικό από το θηλαίο πόρο στην άκρη του καθετήρα, καλλιεργείται στα ανάλογα βακτηριολογικά υποστρώματα.



Εικόνα II.1.
Αριστερά: πλαστικός
καθετήρας 20 G Abbocath®.
Κέντρο: πλαστικός καθετήρας
20 G Abbocath® κομμένος σε
μήκος 6 mm.
Δεξιά: πλαστικός καθετήρας
20 G Abbocath® κομμένος σε
μήκος 2 mm.

Σχεδιασμός των μελετών αξιολόγησης της τεχνικής

Για την αξιολόγηση της ακρίβειας και της ασφάλειας της τεχνικής πραγματοποιήθηκαν τρεις πειραματικές μελέτες, πριν αυτή εφαρμοστεί στο πλαίσιο αυτής της διατριβής.

Η πρώτη μελέτη είχε ως σκοπό την εκτίμηση της ακρίβειας (ευαισθησίας / ειδικότητας) της τεχνικής για την απομόνωση βακτηρίων από το υλικό από το θηλαίο πόρο προβάτων. Για τη μελέτη αυτή συλλέχθηκαν δείγματα θηλών από προβατίνες και ταυτοποιήθηκαν τα βακτήρια στο υλικό από το θηλαίο πόρο τους, χρησιμοποιώντας την παραπάνω τεχνική και συγκρίνοντας τα ευρήματά της με αυτά μιας άλλης καθιερωμένης τεχνικής (Fthenakis 1988, Watkins 1990). Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε δύο φάσεις: στην πρώτη φάση μελετήθηκε η ακρίβεια της τεχνικής σε δείγματα θηλών από σφαγεία, των οποίων η βακτηριολογική κατάσταση ήταν άγνωστη, ενώ στη δεύτερη μελετήθηκε η ακρίβεια της τεχνικής σε δείγματα θηλών από πειραματόζωα, των οποίων η βακτηριολογική κατάσταση ήταν γνωστή.

Στη δεύτερη μελέτη εκτιμήθηκε η ασφάλεια της τεχνικής για το μαστικό αδένι των προβάτων, μέσω της επαναλαμβανόμενης εφαρμογής της σε προβατίνες. Τέλος, στην τρίτη μελέτη εκτιμήθηκε η επαναληψιμότητα των ευρημάτων της τεχνικής, μέσω της σύγκρισης των αποτελεσμάτων σε ζεύγη δειγμάτων υλικού από το θηλαίο πόρο προβάτων.

1η μελέτη: εκτίμηση της ακρίβειας της τεχνικής

Εκτίμηση της ακρίβειας της τεχνικής σε δείγματα θηλών από σφαγεία

Κατά τη διάρκεια της πρώτης φάσης αυτής της μελέτης εξετάστηκαν 384 θηλές από προβατίνες, ηλικίας 3 έως 7 ετών, από τις οποίες 240 προέρχονταν από προβατίνες στη γαλακτική περίοδο και 144 από προβατίνες στην ξηρά περίοδο. Τα δείγματα συλλέχθηκαν σε

σφαγεία του νομού Καρδίτσας. Πριν τη σφαγή κάθε ζώου γινόταν σύντομη κλινική εξέταση (με επισκόπηση και ψηλάφηση) των μαστικών αδένων και των θηλών του. Δείγματα, δηλαδή μαστοί, συλλέχθηκαν μόνον από ζώα χωρίς κλινικά ευρήματα.

Η συλλογή των δειγμάτων έγινε αμέσως μετά τη σφαγή των ζώων και η επεξεργασία τους ολοκληρώθηκε σε 40 min. από τη συλλογή τους. Αρχικά, οι μαστικοί αδένες και οι θηλές εξετάστηκαν με επισκόπηση και ψηλαφήθηκαν σε όλη την έκτασή τους. Όσοι είχαν μακροσκοπικές ανωμαλίες απορρίφθηκαν. Στη συνέχεια, έγινε δειγματοληψία υλικού από το θηλαίο πόρο με την υπό αξιολόγηση τεχνική, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Εννοείται βέβαια ότι η τεχνική εφαρμόστηκε στο μαστό δεδομένου ότι το ζώο είχε θανατωθεί - όμως κατά τα άλλα, πραγματοποιήθηκε όλη η διαδικασία λήψης του υλικού.

Στη συνέχεια, έγινε θηλεκτομή στη βάση κάθε θηλής. Μετά την αποκοπή των δύο θηλών οι μαστικοί αδένες διανοίγονταν σε πολλά σημεία με λεπίδα στείρου χειρουργικού νυστεριού, ώστε να εντοπιστούν τυχόν αλλοιώσεις (π.χ. οζίδια, αποστήματα, κύστεις, σκληρύνσεις). Εάν εντοπίζονταν οποιοσδήποτε μακροσκοπικές νεκροτομικές αλλοιώσεις σε κάποιο μαστικό αδένα ή κάποια θηλή, όλα τα δείγματα από το συγκεκριμένο ζώο απορρίπτονταν. Έτσι, όλα τα δείγματα στην παρούσα μελέτη προέρχονταν από ζώα χωρίς κλινικά ή μακροσκοπικά νεκροτομικά παθολογικά ευρήματα.

Κάθε θηλή συγκρατήθηκε με μικρού μεγέθους πινέζες σε πίνακα από φελλό και, αφού αποστειρώθηκε η επιφάνειά της με επαφή πυρακτωμένης μεταλλικής σπάτουλας, το δέρμα της διανοίχθηκε με σείρα χειρουργική λεπίδα (Paragon Precision Inc., Valencia, ΗΠΑ), πραγματοποιώντας επιμήκη τομή, αποκαλύπτοντας έτσι τους υποδόριους ιστούς. Αυτοί διανοίχθηκαν με τη σειρά τους και αποκαλύφθηκε ο θηλαίος κόλπος. Στη συνέχεια χρησιμοποιώντας νέα λεπίδα, διανοίχθηκαν περαιτέρω οι υποδόριοι ιστοί και αποκαλύφθηκε ο θηλαίος πόρος.

Στη συνέχεια, με ένα ηλεκτρονικό παχύμετρο (Hauptner Instrumente GmbH, Dietlikon-Zurich, Ελβετία) προσδιορίστηκε απόσταση 2 mm από το στόμιο της θηλής, ώστε να διαπιστωθεί το ακριβές σημείο από όπου είχε αρχικά συλλεχθεί το υλικό του θηλαίου πόρου χρησιμοποιώντας τον καθετήρα και, ταυτόχρονα, να προσδιοριστεί το σημείο για τη δειγματοληψία ξέσματος. Κατά τη διάρκεια της μέτρησης το παχύμετρο δεν ερχόταν σε επαφή με το βλεννογόνο της θηλής, ώστε να διατηρηθούν οι συνθήκες άσηπτης δειγματοληψίας.

Τέλος, με χρήση νέας λεπίδας έγινε ελαφρά απόξεση του βλεννογόνου του θηλαίου πόρου.

Εκτίμηση της ακρίβειας της τεχνικής σε δείγματα θηλών από πειραματόζωα

Στη δεύτερη φάση της μελέτης επαναλήφθηκε η παραπάνω διαδικασία σε θηλές προβάτων, που χρησιμοποιήθηκαν ως πειραματόζωα. Μία καλλιέργεια ενός στελέχους *M. haemolytica* ενοφθαλμίστηκε στη μία θηλή αυτών των ζώων (θετικοί μάρτυρες, n=23) με τη χρήση του πλαστικού καθετήρα, ο οποίος είχε κοπεί σε μήκος 2 mm, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Η θηλή απολυμάνθηκε με διάλυμα ιωδιούχου ποβιδόνης (Betadine®-Mundipharma Medical Company, Basel, Ελβετία) και στη συνέχεια εκπλύθηκε με αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό (Βιοσερ Α.Ε., Τρίκαλα) και σκουπίστηκε με αποστειρωμένη γάζα (Κουδουνάς Α.Ε.). Στη συνέχεια, ο καθετήρας τοποθετήθηκε μέσα στη θηλή, προσαρμόστηκε η σύριγγα με το ενοφθάμισμα και έγινε η έγχυσή του. Η μη ενοφθαλμισμένη θηλή κάθε ζώου χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας (n=23). Από κάθε πειραματόζωο λαμβάνονταν καθημερινά δείγματα υλικού από το θηλαίο πόρο των θετικών και των αρνητικών μαρτύρων, χρησιμοποιώντας την παρούσα τεχνική και στη συνέχεια (4 ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό), έγινε ευθανασία (υπό γενική αναισθησία) στο ζώο. Μετά την αφαίρεση του μαστού έγινε δειγματοληψία υλικού από το θηλαίο πόρο με καθετήρα και δειγματοληψία ξεσμάτων με λεπίδα νυστεριού, όπως αναλυτικά περιγράφηκε παραπάνω.

2η μελέτη: εκτίμηση της ασφάλειας της τεχνικής

Σε αυτήν τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 6 πολύτοκες προβατίνες Καραγκούνικης φυλής. Από τα ζώα αυτά ελήφθησαν τρία δείγματα υλικού από το θηλαίο πόρο κατά την περίοδο θηλασμού και πέντε δείγματα κατά την περίοδο άρμεξης. Κάθε διάστημα μεταξύ δύο δειγματοληψιών ήταν 15 ημέρες.

Σε κάθε δειγματοληψία, αρχικά πραγματοποιήθηκε γενική κλινική εξέταση στα ζώα αυτά. 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 οποιεσδήποτε 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 οποιεσδήποτε ανωμαλίες καταγράφηκαν. Μετά, λαμβάνονταν δείγματα υλικού από το θηλαίο πόρο χρησιμοποιώντας τη συγκεκριμένη τεχνική.

Έπειτα από αυτά, πραγματοποιήθηκε εξέταση και συλλογή μαστικού εκκρίματος. Αρχικά έγινε απολύμανση του στομίου και του κατώτερου τμήματος (1 cm) της θηλής με διάλυμα ιωδιούχου ποβιδόνης και στη συνέχεια, έκπλυση με αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό. Οι δύο πρώτες ριπές μαστικού εκκρίματος συλλέχθηκαν πάνω στην παλάμη του δειγματολήπτη και εξετάστηκαν για την ύπαρξη παθολογικών χαρακτηριστικών. Ακολουθούσε η λήψη δείγματος εκκρίματος σε στείρο φιαλίδιο (Amilabo, Chassieu, Γαλλία) για εργαστηριακή εξέτασή του.

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

3η μελέτη: εκτίμηση της επαναληψιμότητας της τεχνικής

Σε αυτήν τη μελέτη συλλέχθηκαν 37 ζεύγη δειγμάτων υλικού από το θηλαίο πόρο από 12 πολύτοκες προβατίνες Καραγκούνικης φυλής, οι οποίες βρίσκονταν στην περίοδο άρμεξης. Τα δύο δείγματα κάθε ζεύγους λαμβάνονταν την ίδια ημέρα, 3 έως 4 ώρες μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας άρμεξης. Τα δύο δείγματα λαμβάνονταν σε διάστημα 30 έως 40 min. μεταξύ τους, χρησιμοποιώντας την ίδια διαδικασία και τεχνική που περιγράφονται παραπάνω. Μεταξύ των δύο δειγματοληψιών κάθε ζεύγους δε μεσολαβούσε καμία παρέμβαση στις θηλές των ζώων.

Εργαστηριακές εξετάσεις

Όλα τα δείγματα που συλλέχθηκαν: υλικό από το θηλαίο πόρο (στην άκρη του πλαστικού καθετήρα), ξέσματα (στη χειρουργική λεπίδα) και δείγματα μαστικού εκκρίματος, καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία με αιματούχο (5% πρόβειο αίμα) άγαρ Columbia (BioMerieux S.A., Marcy-l'-Etoile, Γαλλία), τα οποία επώαστηκαν σε αερόβιο περιβάλλον σε 37 °C έως 72 ώρες. Η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών που αναπτύχθηκαν έγινε με τη χρήση καθιερωμένων βακτηριολογικών εξετάσεων (Barron & Feltham 1993) και τις ταχείες δοκιμές API (BioMerieux S.A., Marcy-l'-Etoile, Γαλλία).

Σε κάθε δείγμα μαστικού εκκρίματος πραγματοποιήθηκε η δοκιμή California Mastitis Test (CMT) (αντιδραστήριο Jorgen Kruuse A/S, Marslev, Δανία), όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο I, Τμήμα Β). 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. Βαθμολόγηση της αντίδρασης με τουλάχιστον "1" θεωρήθηκε ενδεικτική υποκλινικής μαστίτιδας (Fthenakis 1995).

Πίνακας II.i. Πρότυπο βαθμολογίας των αντιδράσεων στη δοκιμή CMT στο μαστικό έκκριμα προβάτων.

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 πήγματος, που συγκεντρωνόταν στο κέντρο ή μετακινείτο προς το άκρο, κατά την ανακίνηση του μίγματος
	Παρουσία στερεού και κολλώδους πήγματος, που σχημάτιζε ομοιογενή μάζα προσκολλημένη στο βυθό του κυπέλλου

Υπολογισμοί και στατιστική ανάλυση

Στην 1η μελέτη η ακρίβεια της τεχνικής (ευαισθησία, ειδικότητα, θετική προγνωστική αξία, αρνητική προγνωστική αξία, συντελεστής Kappa) υπολογίστηκε συσχετίζοντας τα αποτελέσματα των βακτηριολογικών εξετάσεων του υλικού από το θηλαίο πόρο με αυτά των ξεσμάτων. Πραγματοποιήθηκαν δύο διαφορετικές αναλύσεις: μία για τα δείγματα θηλών από τα σφαγεία και μία για τα δείγματα θηλών από τα πειραματόζωα. Ως ευρήματα αναφοράς ("gold standard") ελήφθησαν υπόψη τα αποτελέσματα της βακτηριολογικής εξέτασης των ξεσμάτων.

Στη 2η μελέτη ως κλινική μαστίτιδα ορίστηκε η ύπαρξη κλινικών συμπτωμάτων στο μαστικό αδένα ή η ανίχνευση μη φυσιολογικού μαστικού εκκρίματος. Ως υποκλινική μαστίτιδα ορίστηκε η ταυτόχρονη απομόνωση >10 αποικιών του ίδιου μικροοργανισμού σε καθαρή καλλιέργεια από το μαστικό έκκριμα και η βαθμολόγηση της αντίδρασης στο μαστικό έκκριμα στη δοκιμή CMT με τουλάχιστον "1".

Στην 3η μελέτη υπολογίστηκαν διαστήματα εμπιστοσύνης για την επαναληψιμότητα της τεχνικής, διαφορετικά για τα βακτηριολογικά θετικά και για τα βακτηριολογικά αρνητικά αποτελέσματα.

Σε όλες τις περιπτώσεις η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε χρησιμοποιώντας τα προγράμματα Stata-8 (Stata Corporation LP, College Station, ΗΠΑ) και Epi-Info 6 (CDC, Atlanta, ΗΠΑ).

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

Αποτελέσματα

1η μελέτη: εκτίμηση της ακρίβειας της τεχνικής

Κατά τον προσδιορισμό απόστασης 2 mm από το στόμιο της θηλής, μετά την τομή της, διαπιστώθηκε ότι σε κάθε δειγματοληψία το ακριβές σημείο από όπου είχε αρχικά συλλεχθεί το υλικό χρησιμοποιώντας τον καθετήρα ήταν πράγματι στο θηλαίο πόρο.

Εκτίμηση της ακρίβειας της τεχνικής σε δείγματα θηλών από σφαγεία

Στην πρώτη φάση της μελέτης (δείγματα από σφαγεία) απομονώθηκαν βακτήρια από το υλικό από το θηλαίο πόρο σε 153/240 (64%) θηλές από προβατίνες σε γαλακτική περίοδο και σε 73/144 (51%) θηλές από προβατίνες σε ξηρά περίοδο. Τα αντίστοιχα αποτελέσματα για τα ξέσματα ήταν 142/240 (59%) και 70/144 (49%). Οι μικροοργανισμοί που απομονώθηκαν πιο συχνά ήταν Σταφυλόκοκκοι, *Bacillus* spp. και *Arcanobacterium pyogenes* (Πίνακας II.ii).

Πίνακας II.ii. Συχνότητα απομόνωσης βακτηριακών ειδών από υλικό από το θηλαίο πόρο ή από ξέσματα σε δείγματα από σφαγεία.

Γένος ή είδος βακτηρίων	Αριθμός και συχνότητα βακτηριακών στελεχών από			
	προβατίνες σε γαλακτική περίοδο		προβατίνες σε ξηρή περίοδο	
	υλικό από το θηλαίο πόρο	ξέσματα	υλικό από το θηλαίο πόρο	ξέσματα
Πηκτάση-αρνητικοί Σταφυλόκοκκοι	85 (53%)	77 (53%)	36 (46%)	30 (43%)
<i>S. epidermidis</i>	24	22	10	9
<i>S. simulans</i>	20	19	11	8
<i>S. xylosus</i>	12	11	4	8
<i>S. chromogenes</i>	8	8	9	3
<i>S. sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i>	4	3	0	0
<i>S. auricularis</i>	2	2	0	0
<i>S. schleiferi</i>	2	2	0	0
<i>S. caprae</i>	1	0	2	1
<i>Staphylococcus</i> spp.	12	10	0	1
<i>Bacillus</i> spp.	19 (12%)	14 (10%)	19 (25%)	17 (25%)
<i>B. cereus</i>	2	2	6	5
<i>Bacillus</i> spp.	17	12	13	12
<i>S. aureus</i>	11 (7%)	10 (7%)	4 (5%)	4 (6%)
<i>A. pyogenes</i>	10 (6%)	10 (7%)	2 (3%)	2 (3%)
<i>Kocuria rosea</i>	9 (6%)	9 (6%)	1 (2%)	1 (1%)
<i>Acinetobacter</i> spp.	7 (5%)	7 (5%)	4 (5%)	5 (7%)

Πίνακας II.ii. Συχνότητα απομόνωσης βακτηριακών ειδών από υλικό από το θηλαίο πόρο ή από ξέσματα σε δείγματα από σφαγεία (συνέχεια).

Γένος ή είδος βακτηρίων	Αριθμός και συχνότητα βακτηριακών στελεχών από			
	προβατίνες σε γαλακτική περίοδο		προβατίνες σε ξηρή περίοδο	
	υλικό από το θηλαίο πόρο	ξέσματα	υλικό από το θηλαίο πόρο	ξέσματα
<i>Micrococcus</i> spp.	5 (3%)	4 (3%)	3 (4%)	3 (4%)
<i>Achromobacter</i> spp.	4 (2%)	4 (3%)	1 (1%)	1 (1%)
<i>Escherichia coli</i>	4 (2%)	3 (2%)	4 (5%)	4 (6%)
<i>Corynebacterium</i> spp.	2 (1%)	2 (1%)	0	0
Στρεπτόκοκκοι	1 (1%)	1 (1%)	2 (3%)	2 (3%)
<i>S. ovis</i>	1	1	1	1
<i>Streptococcus</i> spp.	0	0	1	1
<i>M. haemolytica</i>	1 (1%)	1 (1%)	1 (1%)	1 (1%)
<i>Pasteurella multocida</i>	1 (1%)	1 (1%)	0	0
Σύνολο βακτηριακών στελεχών	159	143	77	70

Συνολικά, σε 366/384 (95%) δείγματα από σφαγεία υπήρχε συμφωνία στο αποτέλεσμα της βακτηριολογικής εξέτασης υλικού από το θηλαίο πόρο και ξέσματος (Πίνακας II.iii). Ειδικότερα, από 210 δείγματα υλικού από το θηλαίο πόρο και ξέσματος απομονώθηκαν βακτήρια. Από 198/210 (94%) απομονώθηκαν ακριβώς τα ίδια βακτήρια ή συνδυασμοί βακτηρίων και με τις δύο τεχνικές, ενώ από 8/210 (4%) υπήρχε μερική συμφωνία μεταξύ των δύο τεχνικών στα βακτήρια ή συνδυασμούς βακτηρίων που απομονώθηκαν. Από 156/384 (41%) δείγματα δεν απομονώθηκαν βακτήρια με καμία από τις δύο τεχνικές.

Πίνακας II.iii. Συγκεντρωτικά βακτηριολογικά αποτελέσματα σε υλικό από το θηλαίο πόρο και σε ξέσματα σε δείγματα από σφαγεία ή από πειραματόζωα.

		Ξέσματα θηλών		
		Βακτηριολογικά θετικά	Βακτηριολογικά αρνητικά	Σύνολο
Υλικό από το θηλαίο πόρο	Βακτηριολογικά θετικά	210	16	226
	Βακτηριολογικά αρνητικά	2	156	158
	Σύνολο	212	172	384

Πίνακας II.iii. Συγκεντρωτικά βακτηριολογικά αποτελέσματα σε υλικό από το θηλαίο πόρο και σε ξέσματα σε δείγματα από σφαγεία ή από πειραματόζωα (συνέχεια).

		Ξέσματα θηλών		
		Βακτηριολογικά θετικά	Βακτηριολογικά αρνητικά	Σύνολο
Υλικό από το θηλαίο πόρο	Βακτηριολογικά θετικά	23	0	23
	Βακτηριολογικά αρνητικά	0	23	23
	Σύνολο	23	23	46

Εκτίμηση της ακρίβειας της τεχνικής σε δείγματα θηλών από πειραματόζωα

Στη δεύτερη φάση της μελέτης (δείγματα από πειραματόζωα) απομονώθηκε *M. haemolytica* σε καθαρή καλλιέργεια από 92/92 (100%) δείγματα υλικού από το θηλαίο πόρο από ενοφθαλμισμένες θηλές (θετικοί μάρτυρες) πριν την ευθανασία των ζώων, καθώς και από 23/23 (100%) δείγματα υλικού από το θηλαίο πόρο μετά από αυτήν δεν απομονώθηκαν βακτήρια. Το αντίστοιχο αποτέλεσμα για τα ξέσματα ήταν 23/23 (100%).

Επιπλέον, από 92/92 (100%) δείγματα υλικού από το θηλαίο πόρο από μη ενοφθαλμισμένες θηλές (αρνητικοί μάρτυρες), πριν την ευθανασία των ζώων, και από 23/23 (100%) δείγματα υλικού από το θηλαίο πόρο μετά από αυτήν. Το αντίστοιχο αποτέλεσμα για τα ξέσματα ήταν 23/23 (100%).

Συνολικά, σε 46/46 (100%) δείγματα από πειραματόζωα υπήρχε συμφωνία στο αποτέλεσμα της βακτηριολογικής εξέτασης υλικού από το θηλαίο πόρο και ξέσματος μετά την ευθανασία των ζώων (Πίνακας II.iii). Επιπλέον, σε 184/184 (100%) δείγματα υλικού θηλαίου πόρου, πριν την ευθανασία των ζώων, υπήρχε συμφωνία με το αποτέλεσμα του ξέσματος μετά από αυτήν.

Ανάλυση

Οι παράμετροι συσχέτισης μεταξύ των δύο τεχνικών στα δείγματα από σφαγεία και από πειραματόζωα παρουσιάζονται στον Πίνακα II.iv. Στα δείγματα από σφαγεία η ευαισθησία ήταν 99% και η ειδικότητα 91%, στα δε δείγματα από πειραματόζωα η ευαισθησία και η ειδικότητα ήταν 100%.

Πίνακας II.iv. Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης - συσχέτισης των βακτηριολογικών αποτελεσμάτων σε υλικό από το θηλαίο πόρο και σε ξέσματα σε δείγματα από σφαγεία ή από πειραματόζωα¹

i. Δείγματα από σφαγεία	
Ευαισθησία: 99.1% (96,3-99,8) ²	Θετική προγνωστική αξία: 92,9% (88,5-95,8)
Ειδικότητα: 90.7% (85,1-94,4)	Αρνητική προγνωστική αξία: 98,7% (95,0-99,8)
Συντελεστής Καρρα: 0,9045±0,0509	Τιμή P συντελεστή Καρρα = 0,0000
ii. Δείγματα από πειραματόζωα	
Ευαισθησία: 100% (85,0-100) ²	Ειδικότητα: 100% (85,0-100)

¹: Ως ευρήματα αναφοράς ("gold standard") ελήφθησαν υπόψη τα αποτελέσματα της εξέτασης των ξεσμάτων, ²: 95% διαστήματα εμπιστοσύνης.

2η μελέτη: εκτίμηση της ασφάλειας της τεχνικής

Κατά τη διάρκεια της μελέτης αυτής σε καμία προβατίνα δεν ανιχνεύθηκε κάποια ανωμαλία στο μαστικό έκκριμα, τις θηλές ή τους μαστικούς αδένες. Από κανένα δείγμα μαστικού εκκρίματος δεν απομονώθηκαν βακτήρια. Σε κανένα δείγμα μαστικού εκκρίματος δεν ήταν θετική η δοκιμή CMT. Έτσι, κατά τη διάρκεια της μελέτης, η συχνότητα κλινικής ή υποκλινικής μαστίτιδας ήταν 0%.

Από κανένα από τα 36 δείγματα υλικού από το θηλαίο πόρο από τις προβατίνες κατά την περίοδο θηλασμού δεν απομονώθηκαν βακτήρια. Από 8/60 (13%) δείγματα υλικού από το θηλαίο πόρο από τις προβατίνες κατά την περίοδο άρμεξης απομονώθηκαν βακτήρια (σε όλες τις περιπτώσεις πηκτάση-αρνητικοί Σταφυλόκοκκοι).

3η μελέτη: εκτίμηση της επαναληψιμότητας της τεχνικής

Από 21/37 ζεύγη δειγμάτων δεν απομονώθηκαν βακτήρια από κανένα από τα δύο δείγματα του ζεύγους. Από 16/37 ζεύγη δειγμάτων απομονώθηκαν βακτήρια και από τα δύο δείγματα του ζεύγους. Σε κάθε περίπτωση, τα βακτήρια ήταν τα ίδια και στα δύο δείγματα κάθε ζεύγους. Σε 14/16 περιπτώσεις τα βακτήρια ήταν πηκτάση-αρνητικοί Σταφυλόκοκκοι, σε 1/16 περίπτωση ήταν *S. aureus* και σε 1/16 περίπτωση ήταν *Bacillus* sp..

Το διάστημα εμπιστοσύνης της επαναληψιμότητας της τεχνικής ήταν 87% έως 100% προκειμένου για ένα αρνητικό δείγμα και 83% έως 100% προκειμένου για ένα θετικό δείγμα.

Γ. ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΣΕ ΘΗΛΕΣ ΚΛΙΝΙΚΑ ΥΓΙΩΝ ΠΡΟΒΑΤΩΝ

Υλικά και μέθοδοι

Σχεδιασμός της μελέτης

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε προβατίνες Καραγκούνικης φυλής σε τρεις προβατοτροφικές εκμεταλλεύσεις στην περιοχή Καρδίτσας. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 21 προβατίνες. Από την εκτροφή Α, χρησιμοποιήθηκαν 7 πολύτοκες προβατίνες, από την εκτροφή Β, 6 πολύτοκες και 4 πρωτότοκες προβατίνες και από την εκτροφή Γ, 4 πολύτοκες προβατίνες. Η επιλογή έγινε με βάση τυχαία δειγματοληψία από κάθε εκτροφή.

Κατά τη διάρκεια μιας ολόκληρης γαλακτικής περιόδου (δηλαδή κατά την περίοδο θηλασμού και την περίοδο άρμεξης), λαμβάνονταν δείγματα υλικού από το θηλαίο πόρο και δείγματα μαστικού εκκρίματος από τα παραπάνω ζώα. Επιπλέον, κατά την περίοδο άρμεξης λαμβάνονταν και ένα ακόμη δείγμα υλικού από το θηλαίο πόρο και μαστικού εκκρίματος, μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας άρμεξης.

Εκτροφές

Στην εκτροφή Α εφαρμόζονταν συνθήκες εντατικής διαχείρισης κατά την περίοδο θηλασμού. Οι προβατίνες παρέμεναν συνεχώς σταβλισμένες για περίοδο 50 έως 55 ημερών, σε χώρους 17,5 m² ανά 3 ή 4 ζώα, διευκολύνοντας έτσι τις συνθήκες των συχνών δειγματοληψιών. Κατά την περίοδο άρμεξης εφαρμόζονταν συνθήκες ημι-εντατικής διαχείρισης. Οι προβατίνες παρέμεναν σταβλισμένες κάθε νύχτα και βοσκούσαν σε λειμώνες κάθε πρωί και μεσημέρι, αρμέγονταν δε δύο φορές καθημερινά.

Στην εκτροφή Β εφαρμόζονταν συνθήκες ημι-εντατικής διαχείρισης για όλη τη γαλακτική περίοδο. Τα ζώα παρέμεναν σταβλισμένα κάθε νύχτα και βοσκούσαν σε λειμώνες κάθε πρωί και μεσημέρι. Η διάρκεια της περιόδου θηλασμού ήταν 70 έως 90 ημέρες (ανάλογα με την προγραμματισμένη ημερομηνία σφαγής των αμνών). Στη συνέχεια οι προβατίνες αρμέγονταν δύο φορές καθημερινά.

Στην εκτροφή Γ εφαρμόζονταν συνθήκες εκτατικής διαχείρισης. Τα ζώα βοσκούσαν συνεχώς σε λειμώνες. Η διάρκεια της περιόδου θηλασμού ήταν 60 έως 100 ημέρες (ανάλογα με την προγραμματισμένη ημερομηνία σφαγής των αμνών). Στη συνέχεια οι προβατίνες αρμέγονταν μία φορά καθημερινά.

Σε όλες τις εκτροφές γίνονταν τακτικοί αποπαρασιτισμοί δύο φορές το χρόνο (πριν τον τοκετό και στο τέλος της γαλακτικής περιόδου), καθώς και εμβολιασμοί για πρόληψη της εντεροτοξιναιμίας (πριν τον τοκετό). Σε κανένα από τα ζώα σε αυτήν τη μελέτη δε χορηγήθηκαν αντιμικροβιακοί παράγοντες κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (πριν τη μελέτη) και της γαλακτικής περιόδου (κατά τη διάρκεια της μελέτης). Επιπλέον, προκειμένου να υπάρχει ομοιομορφία στη διαδικασία άρμεξης οι προβατίνες κάθε εκτροφής αρμέγονταν πάντοτε από το ίδιο άτομο.

Δειγματοληψίες

Εκτροφή Α

Από την εκτροφή Α χρησιμοποιήθηκαν επτά πολύτοκες προβατίνες. Το πρώτο δείγμα υλικού από το θηλαίο πόρο και μαστικού εκκρίματος συλλέχθηκε αμέσως μετά τον τοκετό, πριν το(α) αρνί(ιά) θηλάσουν για πρώτη φορά (ημέρα D0₀). Το επόμενο δείγμα συλλέχθηκε 6 έως 9 ώρες μετά το πρώτο (ημέρα D0). Στη συνέχεια, δείγματα συλλέχθηκαν από όλα τα ζώα τις παρακάτω ημέρες μετά τον τοκετό: D1, D2, D4, D7, D10, D14, D21, D35 and D49. Την ημέρα της δειγματοληψίας τα δείγματα συλλέγονταν το πρωί, αμέσως μετά την ολοκλήρωση παράθεσης τροφής στα ζώα. Οι αμνοί απογαλακτίστηκαν σε ηλικία 50 έως 55 ημερών.

Κατά την περίοδο άρμεξης το πρώτο δείγμα συλλέχθηκε την επομένη του απογαλακτισμού των αμνών (ημέρα D'1, D51/56). Στη συνέχεια συλλέχθηκαν άλλα 2 (από 4 ζώα) ή 3 (από 2 ζώα) δείγματα από κάθε προβατίνα. Συγκεκριμένα, δειγματοληψίες έγιναν τις ημέρες D'22 (D72/77), D'43 (D93/98) και D'64 (D114/119). Μία από τις προβατίνες που συμμετείχαν στη μελέτη κατά την περίοδο θηλασμού απομακρύνθηκε από την εκτροφή αμέσως μετά τον απογαλακτισμό των αμνών της. Την ημέρα της δειγματοληψίας τα δείγματα συλλέγονταν το απόγευμα.

Εκτροφή Β

Από την εκτροφή Β χρησιμοποιήθηκαν έξι πολύτοκες και τέσσερις πρωτότοκες προβατίνες. Το πρώτο δείγμα υλικού από το θηλαίο πόρο και μαστικού εκκρίματος συλλέχθηκε την ημέρα D3 έως D20 μετά τον τοκετό. Στη συνέχεια συλλέχθηκαν άλλα τρία δείγματα κατά την

περίοδο θηλασμού, τις ημέρες D24 έως D41, D45 έως D62 και D66 έως D83. Την ημέρα της δειγματοληψίας τα δείγματα συλλέγονταν το πρωί, αμέσως μετά την ολοκλήρωση παράθεσης τροφής στα ζώα. Οι αμνοί απογαλακτίστηκαν σε ηλικία 70 έως 90 ημερών.

Κατά την περίοδο άρμεξης, το πρώτο δείγμα συλλέχθηκε την επομένη του απογαλακτισμού των αμνών (ημέρα D'1, D71/91). Στη συνέχεια συλλέχθηκαν άλλα 5 (από 1 πολύτοκο ζώο) ή 4 (από 4 πολύτοκα ζώα) ή 2 (από τα πρωτότοκα ζώα) δείγματα από κάθε προβατίνα. Συγκεκριμένα, δειγματοληψίες έγιναν τις ημέρες D'15 (D85/105), D'29 (D99/119), D'43 (D113/133), D'57 (D127/147) και D'71 (D141/161). Μία από τις πολύτοκες προβατίνες που συμμετείχαν στη μελέτη κατά την περίοδο θηλασμού απομακρύνθηκε από την εκτροφή αμέσως μετά τον απογαλακτισμό των αμνών της. Την ημέρα της δειγματοληψίας τα δείγματα συλλέγονταν το απόγευμα.

Εκτροφή Γ

Από την εκτροφή Γ χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις πολύτοκες προβατίνες, συλλέχθηκαν δε τρία δείγματα κατά την περίοδο θηλασμού. Εξαιτίας των συνθηκών εκτροφής των ζώων ήταν δύσκολη η ομοιόμορφη δειγματοληψία σε συγκεκριμένες ημέρες. Την ημέρα της δειγματοληψίας τα δείγματα συλλέγονταν το πρωί, όταν τα ζώα βρίσκονταν κοντά στο προβατοστάσιό τους. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι αμνοί απογαλακτίστηκαν σε ηλικία 60 έως 100 ημερών.

Κατά τη διάρκεια της περιόδου άρμεξης το πρώτο δείγμα συλλέχθηκε την επομένη του απογαλακτισμού των αμνών (ημέρα D'1, D61/101). Στη συνέχεια συλλέχθηκαν άλλα 4 δείγματα από κάθε προβατίνα. Συγκεκριμένα, δειγματοληψίες έγιναν τις ημέρες D'22 (D82/122), D'43 (D103/143), D'64 (D124/164) και D'85 (D147/187). Την ημέρα της δειγματοληψίας τα δείγματα συλλέγονταν το απόγευμα.

Διαδικασία δειγματοληψίας

Σε κάθε δειγματοληψία αρχικά πραγματοποιήθηκε γενική κλινική εξέταση στο ζώο. Μετά πραγματοποιήθηκε κλινική εξέταση των μαστικών αδένων και των θηλών, όπως περιγράφηκε παραπάνω (Τμήμα Β). Έπειτα, λαμβάνονταν δείγμα υλικού από το θηλαίο πόρο και τέλος, πραγματοποιήθηκε εξέταση και συλλογή μαστικού εκκρίματος. Η δειγματοληψία υλικού από το θηλαίο πόρο και η συλλογή μαστικού εκκρίματος έγιναν όπως περιγράφηκε παραπάνω (Τμήμα Β).

Κατά την περίοδο άρμεξης των προβάτων, 40 έως 50 min μετά την ολοκλήρωση αυτής της διαδικασίας, συλλέχθηκε ακόμη ένα δείγμα υλικού θηλαίου πόρου και ένα δείγμα μαστικού εκκρίματος, χρησιμοποιώντας τις ίδιες τεχνικές.

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

Συνολικά, συλλέχθηκαν 244 δείγματα υλικού από το θηλαίο πόρο και μαστικού εκκρίματος κατά την περίοδο θηλασμού. Επίσης συλλέχθηκαν 14 δείγματα αμέσως μετά τον τοκετό. Τέλος, συλλέχθηκαν και 156 ζεύγη δειγμάτων υλικού από το θηλαίο πόρο και μαστικού εκκρίματος κατά την περίοδο άρμεξης.

Τα δείγματα διατηρήθηκαν σε ισοθερμικό δοχείο μέχρι την επεξεργασία τους, η οποία ολοκληρώθηκε σε 30 έως 40 min. από τη συλλογή τους.

Εργαστηριακές εξετάσεις

Όλα τα δείγματα που συλλέχθηκαν: υλικό από το θηλαίο πόρο (στην άκρη του πλαστικού καθετήρα) και δείγματα μαστικού εκκρίματος, καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία με αιματούχο (5% πρόβειο αίμα) άγαρ Columbia, τα οποία επωάστηκαν σε αερόβιο περιβάλλον σε 37 °C έως 72 ώρες. Η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών που αναπτύχθηκαν έγινε με τη χρήση καθιερωμένων βακτηριολογικών εξετάσεων (Barrow & Feltham 1993) και τις ταχείες δοκιμές API.

Σε κάθε δείγμα μαστικού εκκρίματος πραγματοποιήθηκε η δοκιμή CMT, όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο I, Τμήμα Β). Το αποτέλεσμα της αντίδρασης βαθμολογήθηκε με έναν από τους πέντε βαθμούς αντίδρασης: "0", "ίχνη", "1", "2", "3", όπως περιγράφηκε παραπάνω (Τμήμα Β). Βαθμολόγηση της αντίδρασης με τουλάχιστον "1" θεωρήθηκε ενδεικτική υποκλινικής μαστίτιδας (Fthenakis 1995).

Υπολογισμοί και στατιστική ανάλυση

Για την ανάλυση των βακτηριολογικών ευρημάτων στις τρεις εκτροφές κατά τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου. Έτσι υπολογίστηκε η πιθανότητα νέων μολύνσεων (όπως αποδεικνύεται από την απομόνωση βακτηρίων από τα δείγματα) σε κάθε σημείο δειγματοληψίας (δηλαδή στο θηλαίο πόρο ή στο μαστικό έκκριμα) για τις παραπάνω ομάδες ζώων.

Για την ανάπτυξη και εκτίμηση των μοντέλων ανάλυσης επιβίωσης έγιναν οι εξής παραδοχές: (α) εάν είχε απομονωθεί κάποιο βακτήριο σε κάποια δειγματοληψία αλλά όχι στην επόμενη της, η μόλυνση είχε αποδράμει στο μέσον μεταξύ των δύο χρονικών σημείων, (β) εάν δεν είχε απομονωθεί κάποιο βακτήριο σε κάποια δειγματοληψία αλλά είχε απομονωθεί στην

επόμενη της, η μόλυνση είχε γίνει στο μέσον μεταξύ των δύο χρονικών σημείων, (γ) εάν είχε απομονωθεί κάποιο βακτήριο σε δύο συνεχείς δειγματοληψίες, η μόλυνση είχε διατηρηθεί για όλο αυτό το χρονικό διάστημα και (δ) μέχρι να απομονωθεί κάποιο βακτήριο το σημείο δειγματοληψίας βρισκόταν σε κίνδυνο μόλυνσης, ενώ μετά την απομόνωσή κάποιου βακτηρίου δε βρισκόταν.

Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε αρχικά η μη παραμετρική μέθοδος Kaplan-Meier, με την οποία υπολογίστηκαν η πιθανότητα και ο χρόνος, ώστε κάθε σημείο δειγματοληψίας σε ένα ζώο ή μία ομάδα ζώων να μην έχει μολυνθεί κατά τη διάρκεια της μελέτης. Μετά, επαναλήφθηκε η διαδικασία χρησιμοποιώντας το μοντέλο αναλογικών κινδύνων του Cox (Cox proportional hazards model) και βρέθηκαν τα ίδια στατιστικά αποτελέσματα. Προκειμένου να απαλειφθεί η πιθανή επίδραση κάποιων ζώων με επαναμόλυνση στο τελικό αποτέλεσμα της ανάλυσης, αυτά ορίστηκαν ως τμήματα ενός Frailty Model.

Προκειμένου να μελετηθεί η πιθανή επίδραση της άρμεξης στα βακτηριολογικά ευρήματα, έγινε σύγκριση των ευρημάτων της βακτηριολογικής εξέτασης υλικού από το θηλαίο πόρο και στο μαστικό έκκριμα μετά την άρμεξη με αυτά πριν την άρμεξη. Πραγματοποιήθηκαν δύο διαφορετικές αναλύσεις: μία για τα δείγματα υλικού από το θηλαίο πόρο και μία για τα δείγματα μαστικού εκκρίματος. 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. Η ανάλυση έγινε αφενός σε όλα τα δείγματα που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια της μελέτης από τις τρεις εκτροφές και αφετέρου στα δείγματα από καθεμιά εκτροφή ξεχωριστά. Ως ευρήματα αναφοράς για αυτήν την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν τα αποτελέσματα της μελέτης εκτίμησης της επαναληψιμότητας της τεχνικής, που περιγράφηκε παραπάνω (Τμήμα Β).

Σε όλες τις περιπτώσεις, η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε χρησιμοποιώντας το στατιστικό πρόγραμμα Stata 9.

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

Αποτελέσματα

Όλες οι προβατίνες ήταν κλινικά υγιείς καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης και δεν παρατηρήθηκαν παθολογικά ευρήματα στους μαστικούς αδένες και τις θηλές τους. Σε κανένα δείγμα μαστικού εκκρίματος η δοκιμή CMT δεν ήταν θετική.

Κατά τη δειγματοληψία αμέσως μετά τον τοκετό (D0₀), απομονώθηκαν βακτήρια από 8/14 δείγματα υλικού από το θηλαίο πόρο και από δείγματα μαστικού εκκρίματος.

Κατά την περίοδο θηλασμού απομονώθηκαν βακτήρια από 52/244 (21%) δείγματα υλικού θηλαίου πόρου και 19/244 (8%) δείγματα μαστικού εκκρίματος. Τα αντίστοιχα αποτελέσματα κατά την περίοδο άρμεξης ήταν 20/156 (13%) και 9/156 (6%) για τα δείγματα πριν τη διαδικασία άρμεξης και 35/156 (22%) και 11/156 (7%) για τα δείγματα μετά τη διαδικασία άρμεξης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα II.v.

Πίνακας II.v. Αποτελέσματα βακτηριολογικής εξέτασης υλικού από το θηλαίο πόρο και μαστικού εκκρίματος από προβατίνες κατά τη διάρκεια μιας γαλακτικής περιόδου.

	Εκτροφή Α	Εκτροφή Β - πολύτοκα ζώα	Εκτροφή Β - πρωτότοκα ζώα	Εκτροφή Γ	Σύνολο
Δείγματα αμέσως μετά τον τοκετό, από τα οποία απομονώθηκαν βακτήρια					
Υλ. θηλ. πόρο	8/14	-	-	-	8/14
Μασ. έκκριμα	7/14	-	-	-	7/14
Δείγματα κατά την περίοδο θηλασμού, από τα οποία απομονώθηκαν βακτήρια					
Υλ. θηλ. πόρο	41/140 ^{β,γ}	6/48 ^γ	5/32 ^γ	0/24 ^γ	52/244 ^α
Μασ. έκκριμα	19/140 ^{β,δ}	0/48 ^δ	0/32 ^δ	0/24 ^δ	19/244 ^α
Δείγματα κατά την περίοδο άρμεξης (πριν την άρμεξη των ζώων), από τα οποία απομονώθηκαν βακτήρια					
Υλ. θηλ. πόρο	5/40	9/52	2/24	4/40	20/156
Μασ. έκκριμα	5/40	1/52	0/24	3/40	9/156
Δείγματα κατά την περίοδο άρμεξης (μετά την άρμεξη των ζώων) από τα οποία απομονώθηκαν βακτήρια					
Υλ. θηλ. πόρο	11/40	10/52	3/24	11/40	35/156
Μασ. έκκριμα	7/40	2/52	0/24	2/40	11/156

Υλ. θηλ. πόρο: υλικό από το θηλαίο πόρο, Μασ. έκκριμα: μαστικό έκκριμα. α: $P < 0,001$, β: $P = 0,002$, γ: $P < 0,01$, δ: $P < 0,001$.

Υπήρχε σημαντική διαφορά στην πιθανότητα απομόνωσης βακτηρίων από το υλικό του θηλαίου πόρου απ' ότι από το μαστικό έκκριμα ($P < 0,001$). Ειδικότερα, η πιθανότητα μόλυνσης στα ζώα της εκτροφής Α κατά την περίοδο του θηλασμού (οπότε έγιναν συχνές δειγματοληψίες) ήταν για μεν το θηλαίο πόρο 90%, για δε το μαστικό παρέγχυμα 52% (Εικόνα II.2). Τα αποτελέσματα αυτά αντιστοιχούν σε 0,046 μολύνσεις καθημερινά (97,5% διάστημα εμπιστοσύνης: 0,030-0,072) προκειμένου για το θηλαίο πόρο και 0,015 μολύνσεις καθημερινά (97,5% διάστημα εμπιστοσύνης: 0,008-0,029) προκειμένου για το μαστικό παρέγχυμα ($P = 0,002$).

Υπήρχε επίσης σημαντική διαφορά μεταξύ των εκτροφών στην πιθανότητα απομόνωσης βακτηρίων από το υλικό του θηλαίου πόρου ($P<0,01$) και το μαστικό έκκριμα ($P<0,001$) κατά την περίοδο του θηλασμού, αλλά όχι κατά την περίοδο της άρμεξης ($P>0,4$ και $P>0,1$, αντίστοιχα). Δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στην πιθανότητα απομόνωσης βακτηρίων κατά την περίοδο του θηλασμού ή της άρμεξης ($P>0,1$). Επίσης, δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στην πιθανότητα απομόνωσης βακτηρίων από το υλικό του θηλαίου πόρου ($P>0,5$) ή από το μαστικό έκκριμα ($P>0,7$) μεταξύ πρωτότοκων και πολύτοκων ζώων στην εκτροφή Β. Βρέθηκαν τα ίδια στατιστικά αποτελέσματα χρησιμοποιώντας και τις δύο τεχνικές.

Όσον αφορά στα ζεύγη δειγμάτων υλικού από το θηλαίο πόρο κατά την περίοδο άρμεξης, σε 27/156 (17%) περιπτώσεις τα αποτελέσματα της βακτηριολογικής εξέτασης καθενός από τα δύο δείγματα του ζεύγους ήταν διαφορετικά. Συγκεκριμένα, σε 6 περιπτώσεις απομονώθηκαν βακτήρια μόνον πριν την άρμεξη και σε 21 περιπτώσεις απομονώθηκαν βακτήρια μόνο μετά την άρμεξη. Τα αντίστοιχα αποτελέσματα για τα δείγματα μαστικού εκκρίματος ήταν 10/156 (6%): 4 και 6 περιπτώσεις (Πίνακας II.vi).

Πίνακας II.vi. Αποτελέσματα βακτηριολογικής εξέτασης υλικού από το θηλαίο πόρο και μαστικού εκκρίματος πριν και μετά την άρμεξη προβάτων.

	Εκτροφή Α	Εκτροφή Β - πολύτοκα ζώα	Εκτροφή Β - πρωτότοκα ζώα	Εκτροφή Γ	Σύνολο
Δείγματα από τα οποία απομονώθηκαν βακτήρια μόνον πριν την άρμεξη					
Υλ. θηλ. πόρο	2/40	3/52	1/24	0/40 ^β	6/156 ^α
Μασ. έκκριμα	1/40	0/52	0/24	3/40	4/156
Δείγματα από τα οποία απομονώθηκαν βακτήρια και πριν και μετά την άρμεξη					
Υλ. θηλ. πόρο	3/40	6/52	1/24	4/40	14/156
Μασ. έκκριμα	4/40	1/52	0/24	0/40	5/156
Δείγματα από τα οποία απομονώθηκαν βακτήρια μόνο μετά την άρμεξη					
Υλ. θηλ. πόρο	8/40	4/52	2/24	7/40 ^β	21/156 ^α
Μασ. έκκριμα	3/40	1/52	0/24	2/40	6/156
Δείγματα από τα οποία δεν απομονώθηκαν βακτήρια ούτε πριν, ούτε μετά την άρμεξη					
Υλ. θηλ. πόρο	27/40	39/52	20/24	29/40	115/156
Μασ. έκκριμα	32/40	50/52	24/24	35/40	141/156

Υλ. θηλ. πόρο: υλικό από το θηλαίο πόρο, Μασ. έκκριμα: μαστικό έκκριμα, α: $P=0.006$ και β: $P=0.002$: όταν συγκρίνονται τα ευρήματα της βακτηριολογικής εξέτασης υλικού από το θηλαίο πόρο, στα οποία βρέθηκαν διαφορετικά αποτελέσματα πριν και μετά την άρμεξη.

Οι διαφορές στα αποτελέσματα της βακτηριολογικής εξέτασης του υλικού από το θηλαίο πόρο πριν και μετά την άρμεξη ήταν στατιστικά σημαντικές όσον αφορά σε όλα τα δείγματα της μελέτης (συγκεντρωτικά όλων των εκτροφών), καθώς ο αριθμός των δειγμάτων από τα οποία απομονώθηκαν βακτήρια αυξήθηκε από 20 σε 35 ($P=0,006$), αλλά και όσον αφορά στα δείγματα της εκτροφής Γ (εκτροφή Α: $P=0,109$, εκτροφή Β: $P=1,000$, εκτροφή Γ: $P=0,016$).

Οι διαφορές στα αποτελέσματα της βακτηριολογικής εξέτασης του μαστικού εκκρίματος πριν και μετά την άρμεξη δεν ήταν στατιστικά σημαντικές ούτε όσον αφορά σε όλα τα δείγματα της μελέτης (συγκεντρωτικά όλων των εκτροφών) καθώς ο αριθμός των δειγμάτων από τα οποία απομονώθηκαν βακτήρια αυξήθηκε από 9 σε 11 ($P=0,754$), ούτε όσον αφορά στα δείγματα καθεμιάς από τις τρεις εκτροφές (εκτροφή Α: $P=0,625$, εκτροφή Β: $P=1,000$, εκτροφή Γ: $P=1,000$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα II.vi.

Η πλειονότητα των βακτηρίων που απομονώθηκαν αμέσως μετά τον τοκετό, κατά την περίοδο του θηλασμού και κατά την περίοδο της άρμεξης (και πριν και μετά την άρμεξη των ζώων) ήταν πηκτάση-αρνητικοί Σταφυλόκοκκοι: *S. simulans*, *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. xylosus*, *S. caprae*, *S. auricularis*, *S. sciuri* subsp. *sciuri*. Τα βακτήρια αυτά αποτελούσαν το 73% (88/120) των στελεχών από υλικό από το θηλαίο πόρο και το 79% (37/47) των στελεχών από μαστικό έκκριμα. Συγκεκριμένα, όσον αφορά στο υλικό από το θηλαίο πόρο αποτελούσαν το 63% των στελεχών που απομονώθηκαν αμέσως μετά τον τοκετό, το 65% των στελεχών που απομονώθηκαν κατά την περίοδο θηλασμού, το 86% των στελεχών που απομονώθηκαν πριν την άρμεξη των ζώων και το 73% των στελεχών που απομονώθηκαν μετά την άρμεξη των ζώων. Τα αντίστοιχα αποτελέσματα όσον αφορά στο μαστικό έκκριμα ήταν 71%, 84%, 78% και 82%.

Άλλοι μικροοργανισμοί που απομονώθηκαν συχνά ήταν *Bacillus* spp., *S. aureus*, *A. pyogenes* και *M. haemolytica*. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα II.vii.

Πίνακας II.vii. Συχνότητα απομόνωσης βακτηριακών ειδών από υλικό από το θηλαίο πόρο ή από μαστικό έκκριμα από προβατίνες κατά τη διάρκεια μιας γαλακτικής περιόδου.

Γένος ή είδος βακτηρίων	Εκτροφή Α n=14/140/40		Εκτροφή Β - πολύτ. ζώα n=48/52		Εκτροφή Β - πρωτότ. ζώα n=32/24		Εκτροφή Γ n=24/40	
	υθπ	με	υθπ	με	υθπ	με	υθπ	με
Δείγματα αμέσως μετά τον τοκετό								
Πηκτάση-αρνητικοί Σταφυλόκοκκοι	5	5						
<i>S. simulans</i>	1	2						
<i>S. epidermidis</i>	1	1	-	-	-	-	-	-
<i>S. chromogenes</i>	1	1	-	-	-	-	-	-
<i>S. xylosus</i>	0	1						
<i>Staphylococcus</i> spp.	2	0						
<i>A. pyogenes</i>	2	1	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	1	1	-	-	-	-	-	-
Σύνολο βακτηριακών στελεχών	8	7	-	-	-	-	-	-
Δείγματα κατά την περίοδο θηλασμού								
Πηκτάση-αρνητικοί Σταφυλόκοκκοι	30	16	5	0	2	0	0	0
<i>S. simulans</i>	6	4	2	0	1	0	0	0
<i>S. caprae</i>	4	3	1	0	0	0	0	0
<i>S. xylosus</i>	3	3	0	0	0	0	0	0
<i>S. chromogenes</i>	3	2	0	0	0	0	0	0
<i>S. auricularis</i>	3	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. epidermidis</i>	2	0	1	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus</i> spp.	9	4	1	0	1	0	0	0
<i>S. aureus</i>	4	1	0	0	0	0	0	0
<i>M. haemolytica</i>	4	0	2	0	0	0	0	0
<i>A. pyogenes</i>	2	2	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus</i> spp.	2	0	0	0	2	0	0	0
<i>B. cereus</i>	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus</i> spp.	1	0	0	0	2	0	0	0
Στρεπτόκοκκοι	2	0	0	0	1	0	0	0
<i>M. roseus</i>	1	0	0	0	0	0	0	0
Σύνολο βακτηριακών στελεχών	45	19	7	0	5	0	0	0

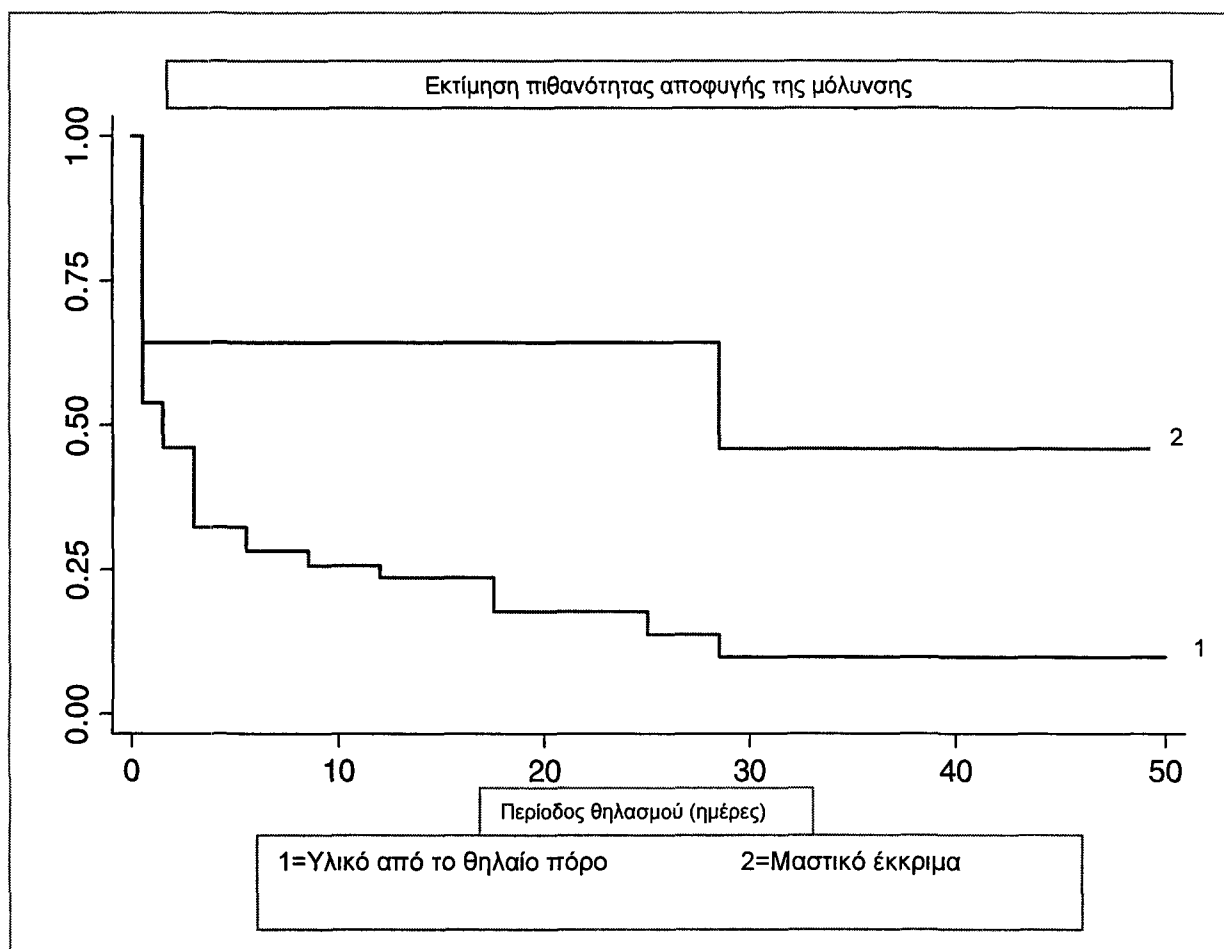
Πίνακας II.vii. Συχνότητα απομόνωσης βακτηριακών ειδών από υλικό από το θηλαίο πόρο ή από μαστικό έκκριμα από προβατίνες κατά τη διάρκεια μιας γαλακτικής περιόδου (συνέχεια).

Γένος ή είδος βακτηρίων	Εκτροφή Α n=14/140/40		Εκτροφή Β - πολύτ. ζώα n=48/52		Εκτροφή Β - πρωτότ. ζώα n=32/24		Εκτροφή Γ n=24/40	
	υθπ	με	υθπ	με	υθπ	με	υθπ	με
Δείγματα κατά την περίοδο άρμεξης (πριν την άρμεξη των ζώων)								
Πηκτάση-αρνητικοί Σταφυλόκοκκοι	3	4	8	1	2	0	6	2
<i>S. simulans</i>	1	1	2	0	2	0	2	1
<i>S. epidermidis</i>	1	1	1	0	0	0	3	1
<i>S. xylosus</i>	1	1	0	0	0	0	0	0
<i>S. sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i>	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>S. chromogenes</i>	0	0	2	0	0	0	1	0
<i>S. caprae</i>	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Staphylococcus</i> spp.	0	0	3	0	0	0	0	0
<i>Bacillus</i> spp.	1	1	0	0	0	0	0	1
<i>M. haemolytica</i>	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	0	0	1	0	0	0	0	0
Σύνολο βακτηριακών στελεχών	5	5	9	1	2	0	6	3
Δείγματα κατά την περίοδο άρμεξης (μετά την άρμεξη των ζώων)								
Πηκτάση-αρνητικοί Σταφυλόκοκκοι	7	5	9	2	2	0	9	2
<i>S. simulans</i>	1	2	1	1	1	0	2	0
<i>S. epidermidis</i>	1	1	3	1	0	0	4	1
<i>S. xylosus</i>	1	1	0	0	0	0	0	0
<i>S. sciuri</i> subsp. <i>siuri</i>	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. chromogenes</i>	0	0	2	0	0	0	2	0
<i>Staphylococcus</i> spp.	3	1	3	0	1	0	1	1
<i>S. aureus</i>	3	1	0	0	0	0	1	0
Στρεπτόκοκκοι	1	0	1	0	1	0	0	0
<i>S. uberis</i>	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Bacillus</i> spp.	0	1	0	0	0	0	3	0
Σύνολο βακτηριακών στελεχών	11	7	10	2	3	0	13	2

πολύτ.: πολύτοκα, πρωτότ.: πρωτότοκα; n: αριθμός δειγμάτων από προβατίνες αμέσως μετά τον τοκετό (μόνον Εκτροφή Α) / κατά την περίοδο θηλασμού / κατά την περίοδο άρμεξης, υθπ: υλικό από το θηλαίο πόρο, με: μαστικό έκκριμα.

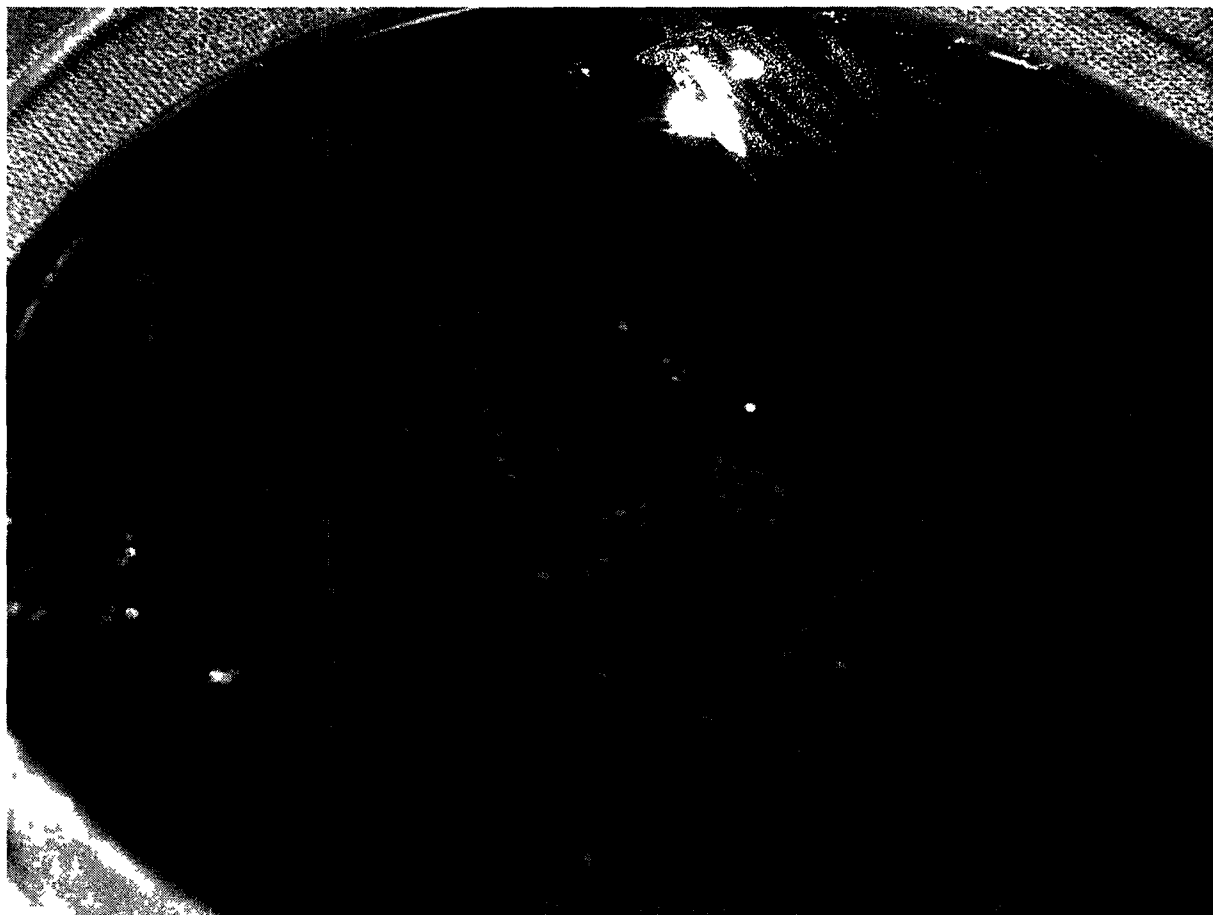
Επαναλαμβανόμενη απομόνωση (σε συνεχόμενες δειγματοληψίες) του ίδιου βακτηριακού είδους, από υλικό από το θηλαίο πόρο ενός συγκεκριμένου ζώου παρατηρήθηκε με *S. aureus*, *S. auricularis* και *S. chromogenes* (τρεις συνεχόμενες φορές κάθε στέλεχος), με *S. simulans* και *S. caprae* (δύο συνεχόμενες φορές κάθε στέλεχος) από προβατίνες της εκτροφής Α, καθώς και με *M. haemolytica* (στέλεχος VSM08L, δύο συνεχόμενες φορές από προβατίνα της εκτροφής Α [Εικόνα II.3] - στέλεχος VSM536L, δύο συνεχόμενες φορές από προβατίνα της εκτροφής Β).

Εικόνα II.2. Διάγραμμα Kaplan-Meier της πιθανότητας μόλυνσης των ζώων της εκτροφής Α κατά την περίοδο του θηλασμού.



Στο διάγραμμα απεικονίζεται η πιθανότητα "επιβίωσης" (δηλαδή αποφυγής της μόλυνσης) του υλικού από το θηλαίο πόρο και του μαστικού εκκρίματος. Έτσι προκύπτει η πιθανότητα μόλυνσής τους.

Εικόνα II.3. Τρυβλίο με αιματούχο άγαρ με καλλιέργεια *M. haemolytica* [επώαση σε αερόβιες συνθήκες επί 24 ώρες]. Το στέλεχος απομονώθηκε 2 συνεχόμενες φορές από υλικό από το θηλαίο πόρο προβατίνας της εκτροφής Α (στέλεχος VSM08L).



Δ. ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΣΕ ΘΗΛΕΣ ΚΛΙΝΙΚΑ ΥΓΙΩΝ ΠΡΟΒΑΤΩΝ

Υλικά και μέθοδοι

Συλλογή και επεξεργασία δειγμάτων

Κατά τη διάρκεια αυτής της μελέτης εξετάστηκαν 87 θηλές από προβατίνες Καραγκούνικης φυλής, ηλικίας 4 έως 6 ετών, οι οποίες βρίσκονταν στη γαλακτική περίοδο ή στην ξηρά περίοδο. Τα δείγματα συλλέχθηκαν σε σφαγείο του νομού Καρδίτσας. Πριν τη σφαγή κάθε ζώου, γινόταν σύντομη κλινική εξέταση (με επισκόπηση και ψηλάφηση) των μαστικών αδένων και των θηλών του. Δείγματα, δηλαδή μαστοί, συλλέχθηκαν μόνον από ζώα χωρίς κλινικά ευρήματα.

Η συλλογή των δειγμάτων έγινε αμέσως μετά τη σφαγή των ζώων και η επεξεργασία τους ολοκληρώθηκε σε 40 min. από τη συλλογή τους. Αρχικά, οι μαστικοί αδένες και οι θηλές εξετάστηκαν με επισκόπηση και ψηλαφήθηκαν σε όλη την έκτασή τους. Όσοι είχαν μακροσκοπικές ανωμαλίες απορρίφθηκαν.

Στη συνέχεια, έγινε θηλεκτομή στη βάση κάθε θηλής. Μετά την αποκοπή των δύο θηλών οι μαστικοί αδένες διανοίγονταν σε πολλά σημεία με λεπίδα στείρου χειρουργικού νυστεριού, ώστε να εντοπιστούν τυχόν αλλοιώσεις (π.χ. οζίδια, αποστήματα, κύστεις, σκληρύνσεις). Εάν εντοπίζονταν οποιοσδήποτε μακροσκοπικές νεκροτομικές αλλοιώσεις σε κάποιο μαστικό αδένα ή κάποια θηλή, όλα τα δείγματα από το συγκεκριμένο ζώο απορρίπτονταν. 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. Εάν από κάποιο δείγμα μαστικού παρεγχύματος απομονώνονταν βακτήρια, όλα τα δείγματα από το συγκεκριμένο ζώο απορρίπτονταν. Έτσι, όλα τα δείγματα στην παρούσα μελέτη προέρχονταν από ζώα χωρίς κλινικά ή μακροσκοπικά νεκροτομικά παθολογικά ευρήματα.

Κάθε θηλή συγκρατήθηκε με μικρού μεγέθους πινέζες σε πίνακα από φελλό και, αφού αποστειρώθηκε η επιφάνειά της με επαφή πυρακτωμένης μεταλλικής σπάτουλας, το δέρμα της διανοίχθηκε με στείρα χειρουργική λεπίδα, πραγματοποιώντας επιμήκη τομή. Έτσι αποκαλύφθηκαν οι υποδόριοι ιστοί. Αυτοί διανοίχθηκαν με τη σειρά τους και αποκαλύφθηκε ο

θηλαίος κόλπος. Στη συνέχεια και χρησιμοποιώντας νέα λεπίδα διανοίχθηκαν περαιτέρω οι υποδόριοι ιστοί και αποκαλύφθηκε ο θηλαίος πόρος. Τέλος, με χρήση τρίτης λεπίδας γινόταν ελαφρά απόξεση του βλεννογόνου του θηλαίου πόρου.

Εργαστηριακές εξετάσεις

Όλα τα δείγματα που συλλέχθηκαν: ξέσματα (στη χειρουργική λεπίδα) και δείγματα μαστικού παρεγχύματος, καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία με αιματούχο (5% πρόβειο αίμα) άγαρ Columbia, τα οποία επωάστηκαν σε αερόβιο περιβάλλον σε 37 °C έως 72 ώρες. Η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών που αναπτύχθηκαν, έγινε με τη χρήση καθιερωμένων βακτηριολογικών εξετάσεων (Barrow & Feltham 1993) και τις ταχείες δοκιμές API.

Τα δείγματα των ιστών τοποθετήθηκαν σε διάλυμα φορμόλης 10%. Στη συνέχεια, στις θηλές έγινε επιμήκης τομή, εμπεδώθηκαν σε παραφίνη και πραγματοποιήθηκαν τομές πάχους 5 μm, για τη χρώση των οποίων χρησιμοποιήθηκε αιματοξυλίνη-εοσίνη (H&E).

Κατάταξη των θηλών σε κατηγορίες

Ανάλογα με την προέλευσή τους και την απομόνωση βακτηρίων από τα ξέσματα από το θηλαίο πόρο οι θηλές κατατάχθηκαν σε μία από τις παρακάτω ομάδες. Στην ομάδα Α (n=23) περιελήφθησαν θηλές από ζώα σε γαλακτική περίοδο, από τα ξέσματα των οποίων δεν απομονώθηκαν βακτήρια (L+B-). Στην ομάδα Β (n=25) περιελήφθησαν θηλές από ζώα σε ξηρά περίοδο, από τα ξέσματα των οποίων δεν απομονώθηκαν βακτήρια (L-B-). Στην ομάδα Γ (n=22) περιελήφθησαν θηλές από ζώα σε γαλακτική περίοδο, από τα ξέσματα των οποίων απομονώθηκαν βακτήρια (L+B+). Τέλος, στην ομάδα Δ (n=17) περιελήφθησαν θηλές από ζώα σε ξηρά περίοδο, από τα ξέσματα των οποίων απομονώθηκαν βακτήρια (L-B+).

Μετά την ιστολογική εξέτασή τους οι θηλές κατατάχθηκαν σε μία από τις παρακάτω κατηγορίες ως προς την παρουσία λεμφοκυττάρων και λεμφικού ιστού σε αυτές. Κατηγορία I: θηλές, όπου δεν παρατηρήθηκε καμία κυτταρική δραστηριότητα, κατηγορία II: θηλές όπου παρατηρήθηκε παρουσία μόνον λεμφοκυττάρων, κατηγορία III: θηλές, όπου παρατηρήθηκαν ≤ 10 περιοχές συνάθροισης λεμφοκυττάρων, κατηγορία IV: θηλές, όπου παρατηρήθηκαν > 10 περιοχές συνάθροισης λεμφοκυττάρων.

Υπολογισμοί και στατιστική ανάλυση

Για τις ανάγκες της στατιστικής ανάλυσης οι παραπάνω κατηγορίες I, II, III, IV μετασχηματίστηκαν σε διχοτομημένες μεταβλητές: παρουσία / απουσία κυτταρικής δραστηριότητας στη θηλή, παρουσία / απουσία λεμφοκυττάρων στη θηλή, παρουσία / απουσία περιοχών λεμφικού ιστού στη θηλή. Για τη σύγκριση μεταξύ ποσοστιαίων αναλογιών εφαρμόστηκαν η διορθωμένη κατά Yates δοκιμή χ^2 και η δοκιμή "Fisher-Exact".

Επιπλέον, εφαρμόστηκε διωνυμική λογιστική παλινδρόμηση προκειμένου να συσχετιστούν αφενός η προέλευση των θηλών (γαλακτική περίοδος, L+ / ξηρά περίοδος, L-) και αφετέρου τα βακτηριολογικά αποτελέσματα των ξεσμάτων (απομόνωση βακτηρίων, B+ / μη απομόνωση βακτηρίων, B-) με τα ιστολογικά ευρήματα.

Σε όλες τις περιπτώσεις, η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε χρησιμοποιώντας τα στατιστικά προγράμματα Stata 8 και Stata 9 και Epi Info.

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

Αποτελέσματα

Το κύριο ιστολογικό εύρημα στις θηλές που εξετάστηκαν ήταν η υποβλεννογόνια λευκοκυτταρική διήθηση. Τα λευκοκύτταρα βρέθηκαν σε μικρής έκτασης συναθροίσεις. Επιπλέον παρατηρήθηκαν επιθηλιακά κύτταρα, καθώς και συνδετικός ιστός και μικρά αιμοφόρα αγγεία σε όλες τις θηλές.

Συγκεκριμένα, στο θηλαίο κόλπο επικρατούσαν λεμφοκύτταρα, αλλά περιστασιακά βρέθηκαν και ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα. Αντίθετα, στο θηλαίο πόρο βρέθηκαν λεμφοκύτταρα και ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα σε περίπου ίση αναλογία (κάθε είδος κυττάρων >45% των συνολικών λευκοκυττάρων).

Όσον αφορά στις θηλές από τις οποίες δεν απομονώθηκαν βακτήρια, στο 46% (22/48) βρέθηκαν λευκοκύτταρα στο θηλαίο κόλπο (Εικόνα II.4.α,β). Αντίθετα, στο 82% (32/39) των θηλών από τις οποίες απομονώθηκαν βακτήρια, βρέθηκαν λευκοκύτταρα στο θηλαίο κόλπο ($P=0.001$). Όμως δεν υπήρχε συσχέτιση του σταδίου της γαλακτικής περιόδου ($P>0.800$) με την ανεύρεση λευκοκυττάρων στο θηλαίο κόλπο.

Λευκοκύτταρα βρέθηκαν σε 7% (3/45) των θηλαίων πόρων προβάτων σε γαλακτική περίοδο και σε 33% (14/42) των θηλαίων πόρων προβάτων σε ξηρά περίοδο ($P=0.004$).

Αντίθετα, δε βρέθηκε σημαντική συσχέτιση της απομόνωσης βακτηρίων με την ανεύρεση λευκοκυττάρων στο θηλαίο πόρο ($P=0.680$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα II.viii.

Πίνακας II.viii. Παρουσία λευκοκυττάρων στις θηλές, ανάλογα με την προέλευση της θηλής.

Ομάδα θηλών	Θηλές με λευκοκύτταρα στο θηλαίο πόρο	Θηλές με λευκοκύτταρα στο θηλαίο κόλπο
A, L+B-, n=23	2 (9%) ¹	11 (48%)
B, L-B-, n=25	6 (24%)	11 (44%)
Γ, L+B+, n=22	1 (5%)	17 (77%)
Δ, L-B+, n=17	8 (47%)	15 (88%)
A και B, B-, n=48	8 (17%)	22 (46%) ^α
Γ και Δ, B+, n=39	9 (23%)	32 (82%) ^α
A και Γ, L+, n=45	3 (7%) ^β	28 (62%)
B και Δ, L-, n=42	14 (33%) ^β	26 (62%)

¹: ποσοστό των θηλών κάθε κατηγορίας, L+: θηλές από ζώα σε γαλακτική περίοδο, L-: θηλές από ζώα σε ξηρά περίοδο, B+: θηλές από τις οποίες απομονώθηκαν βακτήρια, B-: θηλές από τις οποίες δεν απομονώθηκαν βακτήρια, α: $P=0.001$, β: $P=0.003$.

Σε 43 από τις 87 (49%) θηλές που μελετήθηκαν παρατηρήθηκαν συναθροίσεις λεμφοκυττάρων με εικόνα χαρακτηριστική λεμφοζιδίου, με ή χωρίς ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα και βλαστική δραστηριότητα (Εικόνα II.4.γ,δ,στ,ζ). Στις περισσότερες περιπτώσεις αυτές οι συναθροίσεις βρέθηκαν στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου (Εικόνα II.4). Όμως, σε κάποιες θηλές (4 στην ομάδα Γ και 4 στην ομάδα Δ) παρατηρήθηκαν και στο θηλαίο κόλπο (Εικόνα II.4.ε).

Η απομόνωση βακτηρίων, αλλά όχι το στάδιο της γαλακτικής περιόδου, βρέθηκε ότι επηρέαζε σημαντικά την παρουσία ή απουσία κυτταρικής δραστηριότητας (κατηγορία I): $P<0.001$ και $P=0.430$, αντίστοιχα. Λαμβάνοντας υπόψη στην ανάλυση μόνο θηλές στις οποίες υπήρχε κυτταρική δραστηριότητα, η παρουσία συναθροίσεων λεμφοκυττάρων επίσης συσχετίστηκε θετικά με την απομόνωση βακτηρίων ($P=0.032$), αλλά όχι με το στάδιο της γαλακτικής περιόδου ($P=0.636$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα II.ix.

Πίνακας II.ix. Παρουσία συναθροίσεων λεμφοκυττάρων με εικόνα χαρακτηριστική λεμφοζιδίου σε θηλές προβάτων, ανάλογα με την προέλευσή τους, τα αποτελέσματα της βακτηριολογικής εξέτασης και τα ιστολογικά ευρήματα.

Ομάδα	Κατηγορία			
	I	II	III	IV
A, L+B-, n=23	13 (57%) ¹	4 (17%)	6 (26%)	0 (0%)
B, L-B-, n=25	16 (64%)	4 (16%)	5 (20%)	0 (0%)
Γ, L+B+, n=22	3 (14%)	3 (14%)	12 (54%)	4 (18%)
Δ, L-B+, n=17	0 (0%)	1 (6%)	13 (76%)	3 (18%)
A και B, B-, n=48	29 (60%) ^a	8 (17%)	11 (23%)	0 (0%)
Γ και Δ, B+, n=39	3 (8%) ^a	4 (10%)	25 (64%)	7 (18%)
A και Γ, L+, n=45	16 (35.5%)	7 (15.5%)	18 (40%)	4 (9%)
B και Δ, L-, n=42	16 (38%)	5 (12%)	18 (43%)	3 (7%)

¹: ποσοστό των θηλών κάθε κατηγορίας, L+: θηλές από ζώα σε γαλακτική περίοδο, L-: θηλές από ζώα σε ξηρά περίοδο, B+: θηλές από τις οποίες απομονώθηκαν βακτήρια, B-: θηλές από τις οποίες δεν απομονώθηκαν βακτήρια, α: $P < 0.001$.

Εικόνα II.4. Ιστοπαθολογικά ευρήματα σε θηλές κλινικά υγιών προβάτων.



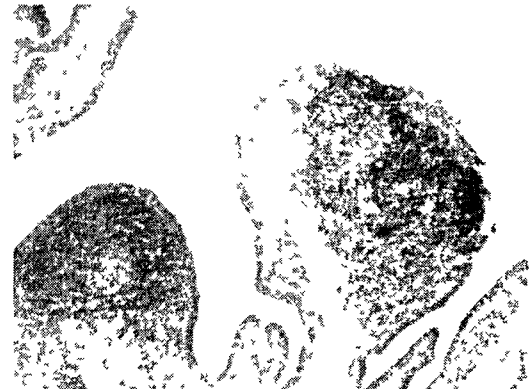
α. Ιστολογική τομή θηλής στην περιοχή του ορίου μεταξύ θηλαίου πόρου-θηλαίου κόλπου χωρίς παρουσία λευκοκυττάρων. Η θηλή προέρχεται από προβατίνα σε γαλακτική περίοδο. Από τη θηλή δεν απομονώθηκαν βακτήρια (X50, χρώση H&E).



β. Ιστολογική τομή θηλής στην περιοχή του θηλαίου πόρου με παρουσία λεμφοκυττάρων. Η θηλή προέρχεται από προβατίνα σε γαλακτική περίοδο. Από τη θηλή απομονώθηκαν βακτήρια (X100, χρώση H&E).



γ. Ιστολογική τομή θηλής στην περιοχή του ορίου μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου, με παρουσία τριών συναθροίσεων λεμφοκυττάρων χωρίς βλαστική δραστηριότητα. Η θηλή προέρχεται από προβατίνα σε γαλακτική περίοδο. Από τη θηλή απομονώθηκαν βακτήρια (X50, χρώση H&E).



δ. Ιστολογική τομή θηλής στην περιοχή του ορίου μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου, με παρουσία συναθροίσεων λεμφοκυττάρων με βλαστική δραστηριότητα. Η θηλή προέρχεται από προβατίνα σε γαλακτική περίοδο. Από τη θηλή απομονώθηκαν βακτήρια (X50, χρώση H&E).

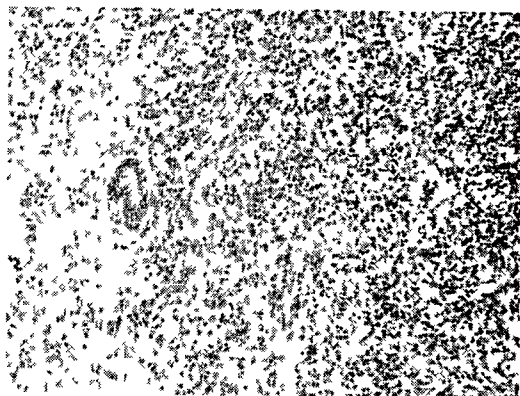
Εικόνα II.3. Ιστοπαθολογικά ευρήματα σε θηλές κλινικά υγιών προβάτων (συνέχεια).



ε. Ιστολογική τομή θηλής στην περιοχή του θηλαίου κόλπου, με παρουσία συναθροίσεων λεμφοκυττάρων χωρίς βλαστική δραστηριότητα. Η θηλή προέρχεται από προβατίνα σε γαλακτική περίοδο. Από τη θηλή απομονώθηκαν βακτήρια (Χ50, χρώση H&E).



στ. Ιστολογική τομή θηλής στην περιοχή του ορίου μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου, με παρουσία συναθροίσεων λεμφοκυττάρων με βλαστική δραστηριότητα. Η θηλή προέρχεται από προβατίνα σε ξηρά περίοδο. Από τη θηλή απομονώθηκαν βακτήρια (Χ50, χρώση H&E).



ζ. Ιστολογική τομή θηλής στην περιοχή του ορίου μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου, με παρουσία συναθροίσεων λεμφοκυττάρων με βλαστική δραστηριότητα. Η θηλή προέρχεται από προβατίνα σε ξηρά περίοδο (εικονίδιο στ). Από τη θηλή απομονώθηκαν βακτήρια (Χ200, χρώση H&E).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ III

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΟΣ *MANNHEIMIA HAEMOLYTICA* ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΥΓΙΕΙΣ ΘΗΛΕΣ ΠΡΟΒΑΤΩΝ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Όπως αναφέρθηκε, το βακτήριο *Mannheimia haemolytica* είναι ένας σημαντικός αιτιολογικός παράγοντας μαστίτιδας σε προβατίνες. Το βακτήριο απομονώθηκε από το δέρμα του μαστού προβάτων που θηλάζονταν, όχι όμως από το δέρμα το μαστού έγκυων προβάτων ή προβάτων που αρμέγονταν (Scott & Jones 1998). Πιστεύεται ότι το βακτήριο πιθανόν μεταφέρεται από τη στοματική κοιλότητα των αμνών στις θηλές των προβάτων και στη συνέχεια στους μαστικούς αδένες (Gunning & Davies 1989, Scott & Jones 1998)

Στις αγελάδες είναι τεκμηριωμένο ότι η θηλή δημιουργεί ένα φραγμό για την εισβολή των μικροοργανισμών στο μαστικό αδέν, καθώς στη μεγάλη πλειονότητα των περιπτώσεων τα βακτήρια εισβάλλουν στο μαστικό αδέν μέσω αυτής. Έτσι αποτελεί και την "πρώτη γραμμή" του αμυντικού συστήματος του μαστικού αδέν (Nickerson & Pankey 1983, Craven & Williams 1985, Nickerson 1985, 1987, Norcross 1991). Παρ' όλα αυτά στη βιβλιογραφία δεν υπάρχει ανάλογη τεκμηρίωση για τη σημασία της θηλής στις προβατίνες.

Σε προηγούμενες μελέτες της παθογένειας της μαστίτιδας στις προβατίνες (El-Masannat 1987, Fthenakis & Jones 1990β, Watkins 1990, El-Masannat και συν. 1991), η εναπόθεση των μικροοργανισμών γινόταν απευθείας μέσα στο μαστικό παρέγχυμα. Η αρχική φάση της ασθένειας, και, συνακόλουθα, ο ρόλος της θηλής των ζώων αγνοήθηκαν.

Προηγουμένως (Κεφάλαιο II, Τμήμα Γ) παρουσιάστηκαν ευρήματα, από τα οποία συνάγεται η δυνατότητα μικροοργανισμών δυνητικά παθογόνων για το μαστικό αδέν (π.χ. *Staphylococcus aureus* ή *M. haemolytica*) να παραμένουν για μακρό χρονικό διάστημα στο θηλαίο πόρο χωρίς να προκαλούν μαστίτιδα. Με βάση αυτά μπορεί να υποτεθεί ότι στη θηλή διατηρείται μία ισορροπία μεταξύ μικροοργανισμών και ζώου, η οποία εφόσον διαταραχθεί μπορεί να καταλήξει σε μαστίτιδα. Η υπόθεση αυτή έγινε για πρώτη φορά από τον Fthenakis (1988), χωρίς όμως να έχει ακολουθήσει πειραματική επιβεβαίωσή της. Τα προηγούμενα ευρήματα (Κεφάλαιο II, Τμήμα Δ), αναδεικνύουν το ρόλο των κυτταρικών αμυντικών μηχανισμών στη θηλή στη διατήρηση της ισορροπίας αυτής.

Για την πειραματική επαλήθευση της υπόθεσης πραγματοποιήθηκε ο πειραματισμός που παρουσιάζεται στο Κεφάλαιο αυτό. Στον πειραματισμό εκείνο διερευνήθηκαν τα αποτελέσματα του πειραματικού ενοφθαλισμού *M. haemolytica* σε κλινικά υγιείς θηλές προβάτων. Επιπλέον περιγράφηκαν τα κλινικά, μικροβιολογικά, κυτταρολογικά και παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά της μόλυνσης.

B. ΣΥΝΕΠΕΙΕΣ ΤΟΥ ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΟΥ

Υλικά και μέθοδοι

Πειραματικός σχεδιασμός, πειραματόζωα και βακτηριακά στελέχη

Ο πειραματισμός πραγματοποιήθηκε με βάση σχετική άδεια από τη Διεύθυνση Κτηνιατρικής της Νομαρχιακής Αυτοδιοίκησης Καρδίτσας. Σε αυτόν χρησιμοποιήθηκαν 32 πρωτότοκες προβατίνες Καραγκούνικης φυλής, κατά τη διάρκεια της γαλακτοπαραγωγικής περιόδου τους. Τα ζώα προέρχονταν από εκτροφή της περιοχής Καρδίτσας. Κατά τη διάρκεια του πειραματισμού τα ζώα σταβλίστηκαν στις εγκαταστάσεις της Κλινικής, τους χορηγούνταν δύο φορές την ημέρα 750 g έτοιμης συμπυκνωμένης ζωοτροφής σε αλευρώδη μορφή (Ζωοτεχνική Καρδίτσας Α.Ε., Καρδίτσα), καθώς επίσης 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 αμνοί των προβάτων απογαλακτίστηκαν τη 18η ημέρα μετά τον τοκετό και στη συνέχεια, τα πειραματόζωα αρμέγονταν, πάντοτε από το ίδιο άτομο, τρεις φορές καθημερινά. Τα ζώα χωρίστηκαν σε δύο ομάδες (Α ή Β, n=16) και ενοφθαλμίστηκαν με ένα από δύο διαφορετικά στελέχη *M. haemolytica*, που χρησιμοποιήθηκαν στον πειραματισμό. Κάθε ομάδα χωρίστηκε σε τέσσερις υποομάδες (n=4) και τα ζώα ενοφθαλμίστηκαν σε διαφορετικά σημεία του μαστικού αδένου ή της θηλής τους (c.f.u.) (Πίνακας III.i).

Το στέλεχος ES26L (El-Masannat 1987), που είχε απομονωθεί από περιστατικό οξείας κλινικής μαστίτιδας στην Αγγλία, έχει τεκμηριωμένη παθογόνο δράση για το μαστικό αδένου των προβάτων, χρησιμοποιήθηκε δε μετά από άδεια του ομότιμου καθηγητή J.E.T Jones. Το στέλεχος VSM08L είχε απομονωθεί σε δύο συνεχόμενες δειγματοληψίες από υλικό από το θηλαίο πόρο από μία κλινικά υγιή προβατίνα (Κεφάλαιο II, Τμήμα Γ). Σε αυτό το ζώο δεν ανιχνεύθηκε κανένα παθολογικό εύρημα στο μαστικό αδένου, η δοκιμή CMT στο έκκριμα ήταν αρνητική και δεν απομονώθηκε αυτό ή κάποιο άλλο βακτήριο από το μαστικό έκκριμα.

Πίνακας III.i. Περιληπτική παρουσίαση του πειραματικού σχεδιασμού.

Υποομάδα (n=4)	Στέλεχος <i>M. haemolytica</i> , που χρησιμοποιήθηκε	Μέθοδος και σημείο ενοφθαλμισμού
A1	ES26L	1220 c.f.u. απευθείας στο γαλακτοφόρο κόλπο
A2	ES26L	Εμβάπτιση της θηλής σε ζωμό με 2×10^8 c.f.u.
A3	ES26L	1220 c.f.u. σε απόσταση 2 mm από το στόμιο της θηλής
A4	ES26L	1220 c.f.u. σε απόσταση 6 mm από το στόμιο της θηλής
B1	VSM08L	1220 c.f.u. απευθείας στο γαλακτοφόρο κόλπο
B2	VSM08L	Εμβάπτιση της θηλής σε ζωμό με 2×10^8 c.f.u.
B3	VSM08L	1220 c.f.u. σε απόσταση 2 mm από το στόμιο της θηλής
B4	VSM08L	1220 c.f.u. σε απόσταση 6 mm από το στόμιο της θηλής

Προετοιμασία του ενοφθαλμίσματος και τεχνική ενοφθαλμισμού

Για να επιτευχθούν άσηπτες, κατά το δυνατόν, συνθήκες μία ημέρα πριν το ενοφθαλμισμό (ημέρα D-1) οι τρίχες των θηλών κάθε προβατίνας κουρευτήκαν με ένα ψαλίδι, το δε δέρμα του μαστού και των θηλών απολυμάνθηκε με διάλυμα χλωρεξιδίνης 5% (Hibitane® Zeneca PLC, Macclesfield, Ηνωμένο Βασίλειο). Ειδικά στις προβατίνες των υποομάδων A2/B2 η απολύμανση με χλωρεξιδίνη παραλήφθηκε και έγινε καθαρισμός και έκπλυση με αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό.

Κάθε στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε για τους ενοφθαλμισμούς καλλιιεργήθηκε 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 ζωμού Soy (BioMerieux S.A., Marcy-l'Etoile Γαλλία), το οποίο επώαστηκε σε αερόβιο περιβάλλον σε θερμοκρασία 37 °C επί 5 ώρες.

Για τις προβατίνες των υποομάδων A1/B1, A3/B3, A4/B4 πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές υποδεκαπλάσιες διαλύσεις του ζωμού σε αποστειρωμένα σωληνάρια με στείρο φωσφορικό διάλυμα pH 7,3 (PBS) (PBS Dulbecco-Biochrom AG, Berlin, Γερμανία). Στη συνέχεια, 0,2 ml της απαιτούμενης διάλυσης αναρροφήθηκε με μία σύριγγα ινσουλίνης. Για τις προβατίνες των υποομάδων A2/B2 χρησιμοποιήθηκε όλη η ποσότητα του ζωμού της καλλιέργειας των βακτηρίων. Ο αριθμός των βακτηριακών κυττάρων (c.f.u.) στο ενοφθαλμισμό προσδιορίστηκε με βάση τη μέθοδο των Miles και Misra (1938).

Οι προβατίνες στις υποομάδες A3/B3 και A4/B4 ενοφθαλμίστηκαν (ημέρα D0) με την παρακάτω μέθοδο. Χρησιμοποιήθηκε στείρος, λεπτός, πλαστικός καθετήρας 20 G (Abbocath®) από τον οποίο είχε αφαιρεθεί ο μεταλλικός οδηγός - βελόνα και είχε κοπεί με στείρα λεπίδα χειρουργικού νυστεριού σε μήκος 2 mm (A3/B3) ή 6 mm (A4/B4), αντίστοιχα (Εικόνα II.1). Για τον ακριβή προσδιορισμό του σημείου τομής χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένος μεταλλικός χάρακας, τοποθετημένος ακριβώς δίπλα στον καθετήρα. Η όλη διαδικασία πραγματοποιούνταν επάνω σε αποστειρωμένη χειρουργική οθόνη, ο δε χειριστής φορούσε χειρουργικά γάντια. Το ζώο καταρρίφθηκε και στη συνέχεια συγκρατήθηκε σε τέτοια θέση, ώστε η περινεϊκή χώρα του

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, οπότε προσαρμόστηκε η σύριγγα με το ενοφθάλμισμα και έγινε η έγχυσή του.

Οι προβατίνες στις υποομάδες A1/B1 ενοφθαλμίστηκαν (ημέρα D0) με την ίδια μέθοδο με την τροποποίηση ότι χρησιμοποιήθηκε ολόκληρος ο καθετήρας (δηλαδή χωρίς να έχει κοπεί). Έτσι το ενοφθάλμισμα τοποθετήθηκε μέσα στο γαλακτοφόρο κόλπο του μαστικού αδένα.

Οι προβατίνες στις υποομάδες A2/B2 ενοφθαλμίστηκαν με την παρακάτω μέθοδο. Οι προβατίνες συγκρατήθηκαν σε όρθια θέση και αρμέχτηκαν, ώστε να κενωθεί τελείως ο μαστικός αδένας τους. Στη συνέχεια, το κατώτερο άκρο της θηλής (3 έως 3,5 cm) εμβάπτιστηκε επί 60 sec. σε φιάλη, η οποία περιείχε 40 ml ζυμού με την καλλιέργεια των βακτηρίων. Μετά από 30 min. οι θηλές εμβάπτιστηκαν πάλι στο ίδιο δοχείο. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε επί δύο συνεχόμενες ημέρες (ημέρα D-1 και ημέρα D0).

Η ίδια ακριβώς τεχνική εφαρμόστηκε για την έγχυση 0,2 ml στείρου PBS, στο αντίστοιχο σημείο της άλλης θηλής (A3/B3, A4/B4) ή στο γαλακτοφόρο κόλπο του άλλου μαστικού αδένου (A1/B1) ή για την εμβάπτιση της άλλης θηλής κάθε προβατίνας σε δοχείο με 40 ml στείρο PBS (A2/B2) ακολουθώντας την ίδια διαδικασία.

Κλινικές και εργαστηριακές εξετάσεις πριν και μετά τον ενοφθαλμισμό

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, έως και την ημέρα του ενοφθαλμισμού (20η ημέρα μετά τον τοκετό, D0). Μετά τον ενοφθαλμισμό κλινική εξέταση των ζώων πραγματοποιείται καθημερινά (εκτός βέβαια εάν είχε ήδη γίνει ευθανασία στο πειραματόζωο). Η κλινική εξέταση έγινε, όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο II, Τμήμα Β).

Δειγματοληψίες

Δειγματοληψία υλικού από το θηλαίο πόρο και μαστικού εκκρίματος πραγματοποιούνταν κάθε δύο ημέρες μετά τον τοκετό, έως και την ημέρα του ενοφθαλμισμού. Μετά τον ενοφθαλμισμό δειγματοληψία μαστικού εκκρίματος πραγματοποιείται καθημερινά. Υλικό από το θηλαίο πόρο λαμβανόταν μόνον από το συγκεκριμένο ζώο κάθε υποομάδας, του οποίου η ευθανασία είχε προγραμματιστεί για την ημέρα D11. Η δειγματοληψία υλικού από το θηλαίο

πόρο και μαστικού εκκρίματος γινόταν, όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο II, Τμήμα Β).

Επιπλέον, γινόταν δειγματοληψία από το δέρμα και το κατώτερο άκρο της θηλής χρησιμοποιώντας αποστειρωμένο βαμβακοφόρο στείλειό (Sterilin Ltd, Stone, Ηνωμένο Βασίλειο) που είχε εμποτιστεί σε στείρο ζωμό Soy. Δειγματοληψία πραγματοποιούνταν κάθε δεύτερη ημέρα, από τη δεύτερη ημέρα μετά τον τοκετό έως και την ημέρα του ενοφθαλμισμού. Μετά από αυτόν πραγματοποιείτο καθημερινά, μόνο στα ζώα των υποομάδων A2/B2.

Κυτταρολογική εξέταση

Σε κάθε δείγμα μαστικού εκκρίματος πραγματοποιήθηκε η δοκιμή CMT, όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο I, 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 μαστικό έκκριμα για χρώση Giemsa (Merck KGaA, Darmstadt, Γερμανία).

Παθολογοανατομική εξέταση

Από κάθε υποομάδα γινόταν ευθανασία ενός ζώου υπό γενική αναισθησία κατά τις ημέρες D2, την D4, την D7 και την D11. 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 εξέταση του. Αρχικά, οι μαστικοί αδένες και οι θηλές εξετάστηκαν με επισκόπηση και ψηλαφήθηκαν σε όλη την έκτασή τους. Στη συνέχεια, έγινε θηλεκτομή στη βάση κάθε θηλής.

Μετά την αποκοπή των δύο θηλών έγιναν πολλαπλές εγκάρσιες διατομές πάχους 10 έως 12 mm στους δύο μαστικούς αδένες. Τα τεμάχια ελέγχθηκαν σε όλη την έκταση και το πάχος τους, ώστε να εντοπιστούν τυχόν αλλοιώσεις. Τέλος, 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. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε για τη λήψη δείγματος από τα επιχώρια λεμφογάγγλια.

Κάθε θηλή συγκρατήθηκε με μικρού μεγέθους πινέζες σε πίνακα από φελλό και, αφού αποστειρώθηκε η επιφάνειά της με επαφή πυρακτωμένης μεταλλικής σπάτουλας, το δέρμα της διανοίχθηκε με στείρα χειρουργική λεπίδα, πραγματοποιώντας επιμήκη κατά μήκος τομή. Έτσι αποκαλύφθηκαν οι υποδόριοι ιστοί. Αυτοί διανοίχθηκαν με τη σειρά τους και αποκαλύφθηκε ο θηλαίος κόλπος. Στη συνέχεια, και χρησιμοποιώντας νέα λεπίδα, διανοίχθηκαν περαιτέρω οι υποδόριοι ιστοί και αποκαλύφθηκε ο θηλαίος πόρος. Τέλος, χρησιμοποιώντας δύο νέες λεπίδες

γινόταν ελαφρά απόξεση του βλεννογόνου του θηλαίου πόρου και του θηλαίου κόλπου. Στη συνέχεια η θηλή ελέγχθηκε σε όλο το μήκος της, ώστε να εντοπιστούν τυχόν αλλοιώσεις.

Μετά την ολοκλήρωση της δειγματοληψίας πραγματοποιήθηκε με ένα ηλεκτρονικό παχύμετρο, προσδιορισμός απόστασης 2 mm ή 6 mm από το στόμιο της θηλής, ώστε να διαπιστωθεί το ακριβές σημείο όπου είχε αρχικά γίνει η εναπόθεση του ενοφθαλμίσματος.

Από κάθε μαστικό αδένα ελήφθησαν δείγματα παρεγχύματος και όλη η θηλή 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). Στη θηλή έγινε επιμήκης τομή, εμπεδώθηκε σε παραφίνη και πραγματοποιήθηκαν τομές πάχους 5 μm, για τη χρώση των οποίων χρησιμοποιήθηκε αιματοξυλίνη-εοσίνη.

Βακτηριολογική εξέταση

Όλα τα δείγματα που συλλέχθηκαν: υλικό από το θηλαίο πόρο, δείγματα μαστικού εκκρίματος, βύσματα από τη δειγματοληψία του δέρματος, ξέσματα (στη χειρουργική λεπίδα) από το θηλαίο πόρο, ξέσματα (στη χειρουργική λεπίδα) από το θηλαίο κόλπο και δείγματα ιστών, καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία με αιματούχο (5% πρόβειο αίμα) άγαρ Columbia, τα οποία επωάστηκαν σε αερόβιο περιβάλλον σε θερμοκρασία 37 °C έως 72 ώρες. Η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών που αναπτύχθηκαν έγινε με τη χρήση καθιερωμένων βακτηριολογικών εξετάσεων (Barrow & Feltham 1993) και τις ταχείες δοκιμές API.

Υπολογισμοί και στατιστική ανάλυση

Σύστημα βαθμολογικής αξιολόγησης των παθολογοανατομικών ευρημάτων

Για την καλύτερη εκτίμηση των παθολογοανατομικών ευρημάτων αναπτύχθηκε ένα σύστημα βαθμολογικής αξιολόγησης, με βάση το οποίο δόθηκαν αριθμητικές τιμές σε όλα τα μακροσκοπικά και μικροσκοπικά ευρήματα στις θηλές των ζώων. Η κλίμακα βαθμολόγησης κυμαινόταν από 0 έως 4 και ήταν διαφορετική για τα μακροσκοπικά και τα μικροσκοπικά ευρήματα. Στη συνέχεια, τα αποτελέσματα αθροίστηκαν, οπότε η συνολική κλίμακα βαθμολόγησης κυμαινόταν από 0 έως 8 βαθμούς ανά θηλή κάθε ζώου. Στην κλίμακα βαθμολογικής αξιολόγησης όλες οι μη ενοφθαλμισμένες θηλές αξιολογήθηκαν με 0.

Το σύστημα βαθμολογικής αξιολόγησης παρουσιάζεται με λεπτομέρεια στον Πίνακα III.ii.

Πίνακας III.ii. Περιγραφή του συστήματος βαθμολογικής αξιολόγησης των παθολογοανατομικών ευρημάτων στις θηλές προβάτων, που ενοφθαλμίστηκαν με *M. haemolytica*.

Βαθμολογία	Περιγραφή
<u>Μακροσκοπικά παθολογοανατομικά ευρήματα</u>	
0	Χωρίς αλλοιώσεις
1	Παρουσία πτυχώσεων στο βλεννογόνο της θηλής
2	Υπεραιμία του βλεννογόνου της θηλής
3	Πάχυνση του βλεννογόνου της θηλής, με αυξημένο αριθμό πτυχώσεων και παρουσία πετεχειών
4	Έντονη πάχυνση του βλεννογόνου της θηλής, χωρίς σαφή διάκριση της μακροσκοπικής δομής του εσωτερικού της θηλής
<u>Ιστοπαθολογικά ευρήματα</u>	
0	Χωρίς αλλοιώσεις
1	Παρουσία λίγων και διάσπαρτων λευκοκυττάρων
2	Παρουσία αυξημένου αριθμού λευκοκυττάρων, συσσωρευμένων κατά ομάδες κάτω από το επιθήλιο της θηλής
3	Παρουσία μεγάλου αριθμού λευκοκυττάρων, ομοιόμορφα κατανεμημένων κάτω από το επιθήλιο της θηλής
4	Παρουσία μεγάλου αριθμού λευκοκυττάρων και υπερπλασία του λεμφικού ιστού στο όριο θηλαίου πόρου-θηλαίου κόλπου

Στατιστική ανάλυση

Ο αριθμός των θετικών στη βακτηριολογική εξέταση αποτελεσμάτων και των θετικών στη δοκιμή CMT αποτελεσμάτων για καθένα από τα δύο βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν (ES26L, VSM08L), καθώς επίσης για τις τρεις μεθόδους ενοφθαλμισμού των θηλών (εμβάπτιση θηλής, ενοφθαλμισμός σε απόσταση 2 mm από το στόμιο της θηλής, ενοφθαλμισμός σε απόσταση 6 mm από το στόμιο της θηλής) συγκρίθηκαν μεταξύ τους. Ο αριθμός των βακτηριολογικά θετικών αποτελεσμάτων από ξέσματα θηλών από καθένα από τα δύο βακτηριακά στελέχη και για τις τρεις μεθόδους ενοφθαλμισμού των θηλών συγκρίθηκαν μεταξύ τους. Το άθροισμα της βαθμολογικής αξιολόγησης των αποτελεσμάτων της νεκροτομικής εξέτασης των ζώων που ενοφθαλμίστηκαν με το στέλεχος ES26L συγκρίθηκε με αυτό των ζώων που ενοφθαλμίστηκαν με το στέλεχος VSM08L.

Χρησιμοποιήθηκε η δοκιμή "Wilcoxin 1" για τη διάμεση τιμή για την αξιολόγηση διαφορών μεταξύ κάθε αποτελέσματος στο σύστημα βαθμολογικής αξιολόγησης των παθολογοανατομικών ευρημάτων και της τιμής "0" (δηλαδή της τιμής, με την οποία αξιολογήθηκαν οι μη ενοφθαλμισμένες θηλές), καθώς επίσης και διαφορές στη διάμεση τιμή μεταξύ μακροσκοπικών νεκροτομικών, ιστολογικών και συνολικών παθολογοανατομικών αποτελεσμάτων. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε η μη παραμετρική δοκιμή Friedman για την αξιολόγηση διαφορών στις διάμεσες τιμές της βαθμολογικής αξιολόγησης μεταξύ των τριών μεθόδων ενοφθαλμισμού των θηλών, καθώς επίσης και μεταξύ των αποτελεσμάτων την ημέρα κατά την οποία έγινε ευθανασία στις προβατίνες.

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

Αποτελέσματα

Κλινικά, βακτηριολογικά και κυτταρολογικά ευρήματα πριν τον ενοφθαλμισμό

Όλες οι προβατίνες ήταν κλινικά υγιείς από τον τοκετό μέχρι τον ενοφθαλμισμό τους. Θηλές τους ήταν μαλακές, χωρίς εξωτερικές ή εσωτερικά ψηλαφητές αλλοιώσεις.

Από τα δείγματα από το δέρμα της θηλής απομονώθηκε μία ποικιλία βακτηρίων, η πλειονότητα των οποίων ήταν πηκτάση-αρνητικοί Σταφυλόκοκκοι. Σε ορισμένες περιπτώσεις απομονώθηκαν και άλλα βακτήρια, όπως *Bacillus* spp. ή *Acinetobacter* spp.. Από τη 12η ημέρα μετά τον τοκετό σποραδικά απομονώθηκε και *M. haemolytica* (από 1 προβατίνα υποομάδας A1, από 2 προβατίνες υποομάδας B2, από 2 προβατίνες υποομάδας A3 και από 1 προβατίνα υποομάδας B4).

Από το υλικό από το θηλαίο πόρο και από το μαστικό έκκριμα δεν απομονώθηκαν βακτήρια.

Η δοκιμή CMT ήταν αρνητική σε όλα τα δείγματα, στα δε επιχρίσματα μαστικού εκκρίματος δεν παρατηρήθηκαν λευκοκύτταρα (Εικόνα III.1.α).

Κλινικά, βακτηριολογικά και κυτταρολογικά ευρήματα μετά τον ενοφθαλμισμό

Υποομάδες A1/B1: ενοφθαλμισμένοι μαστικοί αδένες και σύστοιχες θηλές

Όλες οι προβατίνες (8/8) των υποομάδων A1/B1 εκδήλωσαν κλινική μαστίτιδα 24 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό (D1). Συγκεκριμένα, εκδήλωσαν πυρετό (έως 41,0 °C), ανορεξία, κατάπτωση, χλωρότητα στο σύστοιχο άκρο και ατονία της μεγάλης κοιλίας. Τις επόμενες δύο ημέρες όλα τα ζώα εξακολούθησαν να έχουν πυρετό (έως 40,5 °C), κατάπτωση και χλωρότητα, ενώ, μετά την τρίτη ημέρα, η θερμοκρασία ήταν φυσιολογική (38,2 έως 39,0 °C) και η όρεξή τους αυξήθηκε.

Τα κλινικά ευρήματα στους μαστικούς αδένες όλων των ζώων (8/8) ήταν έντονα και χαρακτηριστικά της κλινικής μαστίτιδας από *M. haemolytica*: αυξημένη θερμοκρασία και αυξημένο μέγεθος του μαστικού αδένα, ερυθρότητα ή κυάνωση του δέρματος του μαστού, σκληρό παρέγχυμα κοντά στη θηλή, πόνος κατά την ψηλάφηση και δυσκολία στην άρμεξη. Τις επόμενες ημέρες (D3), όλα τα ζώα (6/6) παρουσίαζαν παρόμοια συμπτώματα, όμως η σκλήρυνση αφορούσε σε όλο το παρέγχυμα. Τα επιχώρια λεμφογάγγλια ήταν διογκωμένα. Τα μαστικά κλινικά συμπτώματα διήρκεσαν μέχρι την ευθανασία των ζώων.

Την ημέρα D1 σε 5/8 ζώα το μαστικό έκκριμα ήταν ορώδες, ενώ στα υπόλοιπα 3/8 περιείχε πύγματα. Τις επόμενες ημέρες (D3) σε όλα τα ζώα (6/6) παρατηρήθηκε ορώδες οροαιμορραγικό έκκριμα.

Από το μαστικό έκκριμα όλων των ζώων απομονώθηκε *M. haemolytica* σε καθαρή καλλιέργεια για όλη τη διάρκεια του πειραματισμού.

Η δοκιμή CMT ήταν θετική (>1) σε όλα τα δείγματα μαστικού εκκρίματος από όλα τα ζώα (8/8) από την D1 έως την ευθανασία τους.

Στα επιχρίσματα μαστικού εκκρίματος την D1 βρέθηκαν σε όλα τα ζώα (8/8) ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα (97%) και μακροφάγα (3%). Από την D3, σε όλα τα ζώα (6/6), μειώθηκε το ποσοστό των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων (70-73%) και των μακροφάγων (1%), και βρέθηκαν λεμφοκύτταρα (25-29%). Παράλληλα, στα δείγματα εκκρίματος όλων των ζώων (8/8) παρατηρήθηκαν βάκιλοι.

Υποομάδες A2/B2: ενοφθαλμισμένες θηλές και σύστοιχοι μαστικοί αδένες

Κανένα από τα ζώα (0/8) των υποομάδων A2/B2 δεν εκδήλωσε κλινική μαστίτιδα. Τρία ζώα (δύο ενοφθαλμισμένα με το στέλεχος ES26L και ένα με το VSM08L) εκδήλωσαν υποκλινική μαστίτιδα.

Από τα δείγματα από το δέρμα της θηλής απομονώθηκε *M. haemolytica* σε καθαρή καλλιέργεια έως την D3 (8/8). Στη συνέχεια, το βακτήριο απομονώθηκε σε σύμμεκτη καλλιέργεια έως την D8. Από τα δείγματα υλικού από τον θηλαίο πόρο (2/2 ζώα) απομονώθηκε *M. haemolytica* σε καθαρή καλλιέργεια από την D1 έως την D11. Από το μαστικό έκκριμα το βακτήριο απομονώθηκε για πρώτη φορά την D7 (2/4 ζώα) και στη συνέχεια απομονώθηκε έως την D11 (πάντα σε καθαρή καλλιέργεια).

Η δοκιμή CMT ήταν θετική (≥ 1) στα δείγματα μαστικού εκκρίματος από τα ζώα που ενοφθαλμίστηκαν με το στέλεχος ES26L, από την D4. Επίσης, ήταν θετική (≥ 1) στα δείγματα μαστικού εκκρίματος από τα ζώα που ενοφθαλμίστηκαν με το στέλεχος VSM08L, από την D2.

Στα επιχρίσματα μαστικού εκκρίματος βρέθηκαν λευκοκύτταρα. Η πλειονότητά τους ($\geq 95\%$) αρχικά (έως την D3) ήταν μακροφάγα και στη συνέχεια (έως την D5-D6) ήταν ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα. Στη συνέχεια, το ποσοστό των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων μειώθηκε (20-70%), ενώ αυξήθηκε αυτό των μακροφάγων και των λεμφοκυττάρων (20-40% και 20-50%, αντίστοιχα).

Υποομάδες A3/B3: ενοφθαλμισμένες θηλές και σύστοιχοι μαστικοί αδένες

Κανένα από τα ζώα (0/8) των υποομάδων A3/B3 δεν εκδήλωσε κλινική μαστίτιδα. Σε όλα (8/8) παρατηρήθηκε υποκλινική μαστίτιδα. Από αυτά σε 3/8 εκδηλώθηκε την D1, σε 2/5 την D2 και στα υπόλοιπα την D5.

Από τα δείγματα υλικού από το θηλαίο πόρο (2/2 ζώα) απομονώθηκε *M. haemolytica* σε καθαρή καλλιέργεια από την D1 έως την D11. Από το μαστικό έκκριμα το βακτήριο απομονώθηκε για πρώτη φορά την D1 από 3/8 ζώα. Στη συνέχεια, απομονώθηκε από όλα τα ζώα.

Η δοκιμή CMT ήταν θετική ($\geq 1''$) σε όλα τα δείγματα μαστικού εκκρίματος στη πλειονότητα των ζώων (6/8) από την D1, και προοδευτικά και στα δείγματα από τα άλλα δύο.

Στα επιχρίσματα του μαστικού εκκρίματος βρέθηκαν λευκοκύτταρα. Η πλειονότητά τους ($\geq 85\%$) ήταν ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα (Εικόνα III.1.β), ενώ τα υπόλοιπα ήταν μακροφάγα και λεμφοκύτταρα (5-10%). Στη συνέχεια (D4 έως D5), το ποσοστό των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων μειώθηκε (40-60%), ενώ αυξήθηκε αυτό των μακροφάγων και των λεμφοκυττάρων (5-30% και 10-40%, αντίστοιχα).

Υποομάδες A4/B4: ενοφθαλμισμένες θηλές και σύστοιχοι μαστικοί αδένες

Δύο από τις προβατίνες των υποομάδων A4/B4 (μία από κάθε υποομάδα) εκδήλωσαν κλινική μαστίτιδα με ήπια κλινικά συμπτώματα: μία που είχε ενοφθαλμιστεί με ES26L την D7 και μία που είχε ενοφθαλμιστεί με VSM08L την D2. Στα ζώα αυτά παρατηρήθηκε θερμότητα και ερυθρότητα της θηλής και, στη συνέχεια, του μαστικού αδένος. Τα ζώα είχαν θερμοκρασία 38,5 °C έως 39,1 °C, ήπια κατάπτωση και αντίδραση κατά την άρμεξη. Το μαστικό έκκριμά τους ήταν παχύρρευστο και περιείχε πήγματα. Τα υπόλοιπα ζώα εκδήλωσαν υποκλινική μαστίτιδα από την D1 έως την D3.

Από τα δείγματα υλικού του θηλαίου πόρου (2/2 ζώα) απομονώθηκε *M. haemolytica* σε καθαρή καλλιέργεια από την D1 έως την D11. Από το μαστικό έκκριμα το βακτήριο απομονώθηκε για πρώτη φορά την D1 (4/8) και στη συνέχεια (D2) και από τα υπόλοιπα ζώα (4/4).

Η δοκιμή CMT ήταν θετική ($\geq 1''$) σε όλα τα δείγματα μαστικού εκκρίματος από όλα τα ζώα (8/8) από την D1 έως την ευθανασία τους.

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 (10-70%), ενώ αυξήθηκε αυτό των μακροφάγων και των λεμφοκυττάρων (10-20% και 10-60%, αντίστοιχα).

Όλες οι υποομάδες: μη ενοφθαλμισμένοι μαστικοί αδένες και θηλές

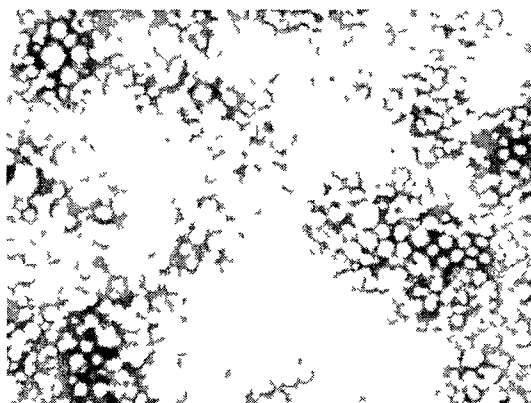
Σε κανένα πειραματόζωο δε βρέθηκαν παθολογικά ευρήματα κατά την κλινική εξέταση των μη ενοφθαλμισμένων μαστικών αδένων ή θηλών. Από κανένα δείγμα μαστικού εκκρίματος από αυτούς τους μαστικούς αδένες δεν απομονώθηκαν βακτήρια. Από τα δείγματα από το δέρμα της θηλής (υποομάδες A2/B2) απομονώθηκαν διάφορα βακτήρια, κυρίως πηκτάση

αρνητικοί Σταφυλόκοκκοι και, δευτερευόντως, *S. aureus*, *Bacillus* spp. και *Acinetobacter* spp. Από κανένα δείγμα δεν απομονώθηκε *M. haemolytica*.

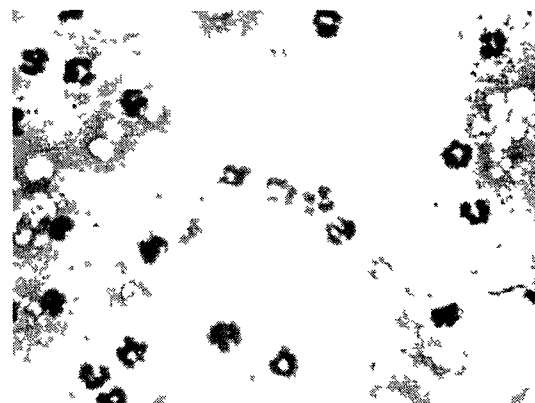
Η δοκιμή CMT δεν ήταν θετική σε κανένα δείγμα μαστικού εκκρίματος. Στα επιχρίσματα του μαστικού εκκρίματος δε βρέθηκαν λευκοκύτταρα.

Τα βακτηριολογικά ευρήματα και τα αποτελέσματα της δοκιμής CMT κατά τη διάρκεια του πειραματισμού παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα III.iii.

Εικόνα III.1. Κυτταρολογικά ευρήματα στο μαστικό έκκριμα προβατίνας υποομάδας Β3.



α. Απουσία λευκοκυττάρων και βακτηρίων στο μαστικό έκκριμα πριν τον ενοφθαλμισμό (Χ400, χρώση Giemsa).



β. Παρουσία ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων στο μαστικό έκκριμα, 3 ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό (Χ400, χρώση Giemsa)

Πίνακας III.iii. Βακτηριολογικά ευρήματα (απομόνωση *M. haemolytica*) και αποτελέσματα της δοκιμής CMT σε δείγματα από προβατίνες, των οποίων η θηλή είχε ενοφθαλμιστεί με το βακτήριο.

	Ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό																	
	D1			D2			D3			D4			D5			D6		
	2 ^α	3 ^α	4 ^α	2	3	4	2	3	4	2	3	4	2	3	4	2	3	4
Απομόνωση βακτηρίου	Υποομάδα																	
Δέρμα θηλ. β	-	-	8/8	-	-	6/6	-	-	6 ¹ /6	-	-	2 ¹ /4	-	-	2 ¹ /4	-	-	1 ¹ /4
Υλ. θηλ. π. β	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	1/2	2/2	1/2	2/2	2/2	0/2
Μασ. έκκρ. β	0/8	3/8	4/8	0/8	5/8	5/8	0/6	4/6	5/6	0/6	5/6	4/6	0/4	4/4	3/4	0/4	3/4	2/4
Αποτελέσματα CMT																		
Θετικά	2/8	6/8	8/8	3/8	8/8	7/8	3/6	5/6	5/6	4/6	5/6	5/6	3/4	4/4	4/4	1/4	3/4	4/4
	Ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό												D11					
	D7			D8			D9			D10			D11					
	2 ^ο	3 ^ο	4 ^ο	2	3	4	2	3	4	2	3	4	2	3	4	2	3	4
Απομόνωση βακτηρίου	Υποομάδα																	
Δέρμα θηλ.	1 ¹ /4	-	1 ¹ /2	-	-	0 ¹ /2	-	0 ¹ /2	-	0 ¹ /2	-	0 ¹ /2	-	0 ¹ /2	-	-	-	-
Υλ. θηλ. π.	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
Μασ. έκκρ.	2/4	3/4	3/4	1/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
Αποτελέσματα CMT																		
Θετικά	3/4	4/4	3/4	1/2	1/2	2/2	2/2	2/2	0/2	0/2	1/2	2/2	1/2	2/2	1/2	2/2	1/2	2/2

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως η/μ=θετικά αποτελέσματα στο σύνολο των δειγμάτων που ελήφθησαν.

α. 2=Υποομάδες A2 και B2, 3=Υποομάδες A3 και B3, 4=Υποομάδες A4 και B4.

β. Δέρμα θηλ.: δέρμα θηλής, Υλ. θηλ. π.: υλικό από το θηλαίο πόρο, Μασ. έκκρ.: μαστικό έκκριμα.

γ. Απομόνωση *M. haemolytica* σε σύμμεκτη καλλιέργεια.

Μακροσκοπικά νεκροτομικά ευρήματα

Υποομάδες A1/B1: ενοφθαλμισμένοι μαστικοί αδένες και σύστοιχες θηλές

Κατά τη μακροσκοπική νεκροτομική εξέταση των ενοφθαλμισμένων μαστικών αδένων αυτών των ζώων παρατηρήθηκαν οι χαρακτηριστικές αλλοιώσεις κλινικής μαστίτιδας από *M. haemolytica*. Δεν παρατηρήθηκαν αλλοιώσεις σε άλλα όργανα εκτός από το μαστικό αδένος και τα επιχώρια λεμφογάγγλια.

Τα κύρια παθολογοανατομικά ευρήματα στο μαστικό παρέγχυμα των προβάτων στις οποίες έγινε ευθανασία την ημέρα D2 ή D4 ήταν αυτά οξείας κλινικής μαστίτιδας: υποδόριο οίδημα και εμφύσημα στο μαστικό αδένος, εκροή αιμορραγικού υγρού από την επιφάνεια τομής πολυεστιακές περιοχές με αιμορραγίες στο παρέγχυμα που διαχωρίζονταν σαφώς από τους γειτονικούς ιστούς και παρουσία πυώδους συλλογής σε διάφορες περιοχές του παρεγχύματος. Επίσης, παρατηρήθηκαν συμφόρηση και διάταση των αγγείων και περιστασιακά βρέθηκαν πήγματα γάλακτος προσκολλημένα στο παρέγχυμα. Στους γαλακτοφόρους πόρους υπήρχαν πήγματα γάλακτος και ινική. Οι γαλακτοφόροι πόροι και ο γαλακτοφόρος κόλπος περιείχαν συναθροίσεις εξιδρώματος, ινική και θρόμβους αίματος. Τα επιχώρια λεμφογάγγλια ήταν έντονα διογκωμένα και οίδηματικά.

Στα ζώα στα οποία έγινε ευθανασία την ημέρα D7 ή D11 τα ευρήματα ήταν από χρονιότερης κλινικής μαστίτιδας: περιοχές με αιμορραγίες (κυρίως στο ζώο στο οποίο έγινε ευθανασία την D7), υπόλευκες περιοχές στο παρέγχυμα χαρακτηριστικές αρχόμενης ίνωσης (κυρίως στο ζώο στο οποίο έγινε ευθανασία την D11) και αποστήματα. Επιπλέον, βρέθηκαν διογκωση των επιχώριων λεμφογαγγλίων.

Σε κανένα ζώο δεν παρατηρήθηκαν αλλοιώσεις στις θηλές.

Από τα δείγματα από τα εσωτερικά όργανα των ζώων δεν απομονώθηκαν βακτήρια. Από όλα τα δείγματα μαστικού παρεγχύματος και επιχώριων λεμφογαγγλίων -όχι όμως από τα ξέσματα από τις θηλές- απομονώθηκε *M. haemolytica* σε καθαρή καλλιέργεια.

Υποομάδες A2/B2: ενοφθαλμισμένες θηλές και σύστοιχοι μαστικοί αδένες

Οι θηλές των ζώων στα οποία έγινε ευθανασία την ημέρα D2, D4 ή D7, φαινόταν φυσιολογικές με λεία εσωτερική επιφάνεια και σαφή διαχωρισμό του θηλαίου πόρου από το θηλαίο κόλπο. Σε ένα ζώο στο οποίο έγινε ευθανασία την ημέρα D7 (ενοφθαλμισμένο με το στέλεχος ES26L) παρατηρήθηκαν πτυχώσεις και αυξημένη αγγείωση στο βλεννογόνο του θηλαίου κόλπου. Στα ζώα στα οποία έγινε ευθανασία την ημέρα D11 παρατηρήθηκαν πάχυνση του βλεννογόνου του θηλαίου πόρου και του θηλαίου κόλπου, στένωση του αυλού της θηλής και πετέχειες στη βάση της.

Στο μαστικό παρέγχυμα και τα επιχώρια λεμφογάγγλια των ζώων των υποομάδων A2/B2 δεν παρατηρήθηκαν μακροσκοπικά παθολογικά ευρήματα.

M. haemolytica απομονώθηκε σε καθαρή καλλιέργεια από το θηλαίο πόρο και το θηλαίο κόλπο ορισμένων ζώων (Πίνακας III.iv), όχι όμως από το μαστικό παρέγχυμα, τα επιχώρια λεμφογάγγλια και τα εσωτερικά όργανα.

Υποομάδες A3/B3: ενοφθαλμισμένες θηλές και σύστοιχοι μαστικοί αδένες

Κατά τη μέτρηση του μήκους του αυλού της θηλής διαπιστώθηκε ότι το ενοφθάλμισμα είχε τοποθετηθεί πάντα στο θηλαίο πόρο.

Οι θηλές των ζώων στα οποία έγινε ευθανασία την ημέρα D2 ή D4 φαίνονται φυσιολογικές με λεία εσωτερική υφή και σαφή διαχωρισμό του θηλαίου πόρου από το θηλαίο κόλπο. Στα ζώα στα οποία έγινε ευθανασία την ημέρα D7 παρατηρήθηκαν πάχυνση του βλεννογόνου και πετέχειες στο θηλαίο κόλπο (Εικόνα III.2.α). Στα ζώα στα οποία έγινε ευθανασία την ημέρα D11 βρέθηκαν έντονη πάχυνση του βλεννογόνου του θηλαίου πόρου και του θηλαίου κόλπου, με στένωση του αυλού της θηλής, καθώς επίσης και ερυθρότητα και εκτεταμένες πετέχειες στη βάση της θηλής (Εικόνα III.3.α).

Στο μαστικό παρέγχυμα και τα επιχώρια λεμφογάγγλια των ζώων των υποομάδων A3/B3 δεν παρατηρήθηκαν μακροσκοπικά παθολογικά ευρήματα.

M. haemolytica απομονώθηκε σε καθαρή καλλιέργεια από το θηλαίο πόρο, το θηλαίο κόλπο και το μαστικό παρέγχυμα ορισμένων ζώων (Πίνακας III.iv), όχι όμως από τα επιχώρια λεμφογάγγλια και τα εσωτερικά όργανα.

Υποομάδες A4/B4: ενοφθαλμισμένες θηλές και σύστοιχοι μαστικοί αδένες

Κατά τη μέτρηση του μήκους του αυλού της θηλής διαπιστώθηκε ότι το ενοφθάλμισμα είχε τοποθετηθεί πάντα στο θηλαίο κόλπο.

Στα ζώα στα οποία έγινε ευθανασία την ημέρα D2 ή D4 παρατηρήθηκαν πάχυνση του βλεννογόνου της θηλής και απώλεια της χαρακτηριστικής εσωτερικής δομής της θηλής, με το σαφή διαχωρισμό του θηλαίου πόρου από το θηλαίο κόλπο. Στα ζώα στα οποία έγινε ευθανασία την ημέρα D7 παρατηρήθηκαν επιπλέον πτυχωσείς στο βλεννογόνο της θηλής και πετέχειες στο θηλαίο κόλπο. Στα ζώα στα οποία έγινε ευθανασία την ημέρα D11 παρατηρήθηκαν έντονη πάχυνση του βλεννογόνου της θηλής και στένωση του αυλού της θηλής.

Στο μαστικό παρέγχυμα και τα επιχώρια λεμφογάγγλια των ζώων των υποομάδων A4/B4 δεν παρατηρήθηκαν μακροσκοπικά παθολογικά ευρήματα.

M. haemolytica απομονώθηκε από τον θηλαίο πόρο, το θηλαίο κόλπο και το μαστικό παρέγχυμα ορισμένων ζώων (Πίνακας III.iv), όχι όμως από τα επιχώρια λεμφογάγγλια και τα εσωτερικά όργανα.

Όλες οι υποομάδες: μη ενοφθαλισμένοι μαστικοί αδένες και θηλές

Σε κανένα από τους μη ενοφθαλισμένους μαστικούς αδένες και θηλές δε παρατηρήθηκαν μακροσκοπικά νεκροτομικά ευρήματα. Από κανένα δείγμα δεν απομονώθηκαν βακτήρια.

Πίνακας III.iv. Μεταθανάτια απομόνωση *M. haemolytica* από προβατίνες, των οποίων η θηλή είχε ενοφθαλιστεί με το βακτήριο.

Σημείο απομόνωσης	Ημέρα μετά τον ενοφθαλισμό (ημέρα ευθανασίας)											
	D2			D4			D7			D11		
	Υποομάδα											
	2 ^α	3 ^α	4 ^α	2	3	4	2	3	4	2	3	4
Θηλαίος πόρος	1/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
Θηλαίος κόλπος	0/2	1/2	2/2	1/2	2/2	1/2	1/2	1/2	1/2	0/2	2/2	2/2
Μαστικό παρέγχυμα	0/2	1/2	1/2	0/2	1/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	2/2	1/2

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως n/m=θετικά αποτελέσματα στο σύνολο των δειγμάτων που ελήφθησαν. α. 2=Υποομάδες A2 και B2, 3=Υποομάδες A3 και B3, 4=Υποομάδες A4 και B4.

Ιστοπαθολογικά ευρήματα

Υποομάδες A1/B1: ενοφθαλισμένοι μαστικοί αδένες και σύστοιχες θηλές

Στις θηλές αυτών των ζώων δεν παρατηρήθηκε κανένα παθολογικό εύρημα.

Τα κύρια ιστοπαθολογικά ευρήματα στο μαστικό παρέγχυμα ήταν όμοια με αυτά, τα οποία έχουν περιγραφεί από άλλους ερευνητές (El-Masannat 1987, El-Masannat και συν. 1991), για τη μαστίδα από *M. haemolytica*. Στα ζώα στα οποία έγινε ευθανασία την ημέρα D2 ή D4 παρατηρήθηκε έντονη διήθηση από ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα στο μεσοκυψελιδικό χώρο και μέσα στις αδενοκυψελίδες, εξαγγελίωση και καταστροφή των επιθηλιακών κυττάρων και των αδενοκυψελίδων. Στα ζώα στα οποία έγινε ευθανασία την ημέρα D7 ή D11 υπήρχαν ευρήματα χρόνιας μαστίδας, διήθηση από λεμφοκύτταρα και παρουσία ινοβλαστών, χαρακτηριστικά αρχόμενης ίνωσης.

Υποομάδες A2/B2: ενοφθαλισμένες θηλές και σύστοιχοι μαστικοί αδένες

Στα ζώα στα οποία έγινε ευθανασία την ημέρα D2 παρατηρήθηκε υποβλεννογόνια διήθηση από λεμφοκύτταρα στο θηλαίο πόρο και από λεμφοκύτταρα και πλασμοκύτταρα στο θηλαίο πόρο. Στα ζώα στα οποία έγινε ευθανασία την ημέρα D4 παρατηρήθηκε υποβλεννογόνια διήθηση από λεμφοκύτταρα στο θηλαίο πόρο και από λεμφοκύτταρα και ουδετερόφιλα στο θηλαίο κόλπο. Στα ζώα στα οποία έγινε ευθανασία την ημέρα D7 ή D11 παρατηρήθηκε υποβλεννογόνια διήθηση από λεμφοκύτταρα και πλασμοκύτταρα στο θηλαίο πόρο και από λεμφοκύτταρα στο θηλαίο κόλπο. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν συναθροίσεις λεμφοκυττάρων με εικόνα χαρακτηριστική λεμφοζιδίου, με ή χωρίς ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα και βλαστική δραστηριότητα, στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου (Εικόνα III.4.α,β).

Στο μαστικό παρέγχυμα των ζώων στα οποία έγινε ευθανασία την ημέρα D2 ή D4 δε παρατηρήθηκαν παθολογικά ευρήματα. Στα ζώα στα οποία έγινε ευθανασία την ημέρα D7 ή D11 παρατηρήθηκε ήπια λευκοκυτταρική διήθηση (ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα).

Υποομάδες A3/B3: ενοφθαλμισμένες θηλές και σύστοιχοι μαστικοί αδένες

Στα ζώα στα οποία έγινε ευθανασία την ημέρα D2 παρατηρήθηκε μαζική υποβλεννογόνια διήθηση από λεμφοκύτταρα και πλασμοκύτταρα στο θηλαίο πόρο και στο θηλαίο κόλπο. Στα ζώα στα οποία έγινε ευθανασία την ημέρα D4 παρατηρήθηκε υποβλεννογόνια διήθηση από λεμφοκύτταρα στο θηλαίο πόρο. Στα ζώα στα οποία έγινε ευθανασία την ημέρα D7 ή D11 παρατηρήθηκε μαζική υποβλεννογόνια διήθηση από λεμφοκύτταρα και πλασμοκύτταρα στο θηλαίο πόρο και θηλαίο κόλπο (Εικόνα III.2.β). Επιπλέον, παρατηρήθηκαν συναθροίσεις λεμφοκυττάρων με εικόνα χαρακτηριστική λεμφοζιδίου, με ή χωρίς ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα και βλαστική δραστηριότητα, στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου (Εικόνα III.3.β και Εικόνα III.5).

Στο μαστικό παρέγχυμα των ζώων στα οποία έγινε ευθανασία την ημέρα D2 ή D4 δε παρατηρήθηκαν παθολογικά ευρήματα. Στα ζώα στα οποία έγινε ευθανασία την ημέρα D7 ή D11 παρατηρήθηκε εστιακή λευκοκυτταρική διήθηση (ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα και λεμφοκύτταρα), καταστροφή των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων, μικρού βαθμού εξαγγείωση και καταστροφή των επιθηλιακών κυττάρων (Εικόνα III.2.γ και Εικόνα III.3.γ).

Υποομάδες A4/B4: ενοφθαλμισμένες θηλές και σύστοιχοι μαστικοί αδένες

Στα ζώα στα οποία έγινε ευθανασία την ημέρα D2 παρατηρήθηκε υποβλεννογόνια διήθηση από λεμφοκύτταρα και πλασμοκύτταρα στο θηλαίο πόρο και το θηλαίο κόλπο. Στα ζώα στα οποία έγινε ευθανασία την ημέρα D4 ή την D7 παρατηρήθηκαν ήπια υποβλεννογόνια διήθηση από λεμφοκύτταρα στο θηλαίο πόρο ενός ζώου, ενώ στο άλλο βρέθηκαν λεμφοκύτταρα και πλασμοκύτταρα στο θηλαίο πόρο και θηλαίο κόλπο (Εικόνα III.6.α). Στα ζώα στα οποία έγινε ευθανασία την ημέρα D11 παρατηρήθηκε υποβλεννογόνια διήθηση από λεμφοκύτταρα, πλασμοκύτταρα και ουδετερόφιλα στο θηλαίο κόλπο και από πλασμοκύτταρα και λεμφοκύτταρα στο θηλαίο κόλπο (Εικόνα III.7).

Στο μαστικό παρέγχυμα των ζώων παρατηρήθηκαν λευκοκυτταρική διήθηση (ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα και λεμφοκύτταρα), καταστροφή των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων, εξαγγείωση και καταστροφή επιθηλιακών κυττάρων και των αδενοκυψελίδων (Εικόνα III.6.β).

Όλες οι υποομάδες: μη ενοφθαλμισμένοι μαστικοί αδένες και θηλές

Σε κανένα από τους μη ενοφθαλμισμένους μαστικούς αδένες και θηλές δε παρατηρήθηκαν ιστοπαθολογικά ευρήματα.

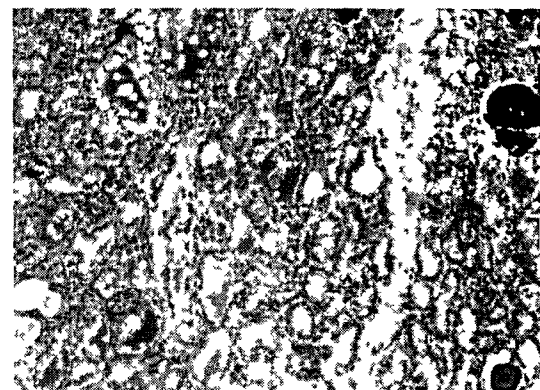
Εικόνα III.2. Παθολογοανατομικά ευρήματα σε προβατίνα υποομάδας Β3, στην οποία έγινε ευθανασία 7 ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό



α Πάχυνση του βλεννογόνου του θηλαίου πόρου



β Υποβλεννογόνια διήθηση από λεμφοκύτταρα και πλασμοκύτταρα, καθώς και συνάθροιση ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου (Χ100, χρώση Η&Ε)

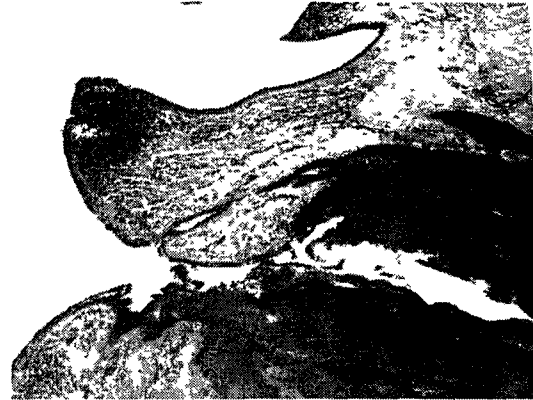


γ Λευκοκυτταρική διήθηση (ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα και λεμφοκύτταρα), εξαγγείωση, καταστροφή των αδενοκυψελίδων (Χ200, χρώση Η&Ε)

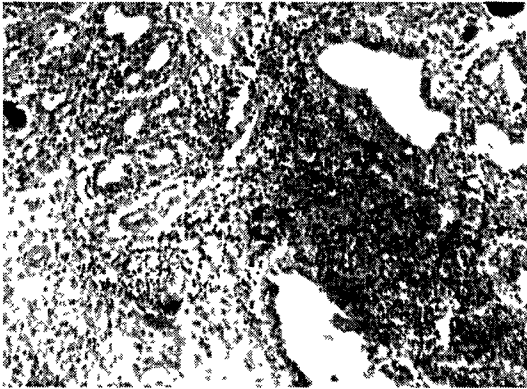
Εικόνα III.3. Παθολογοανατομικά ευρήματα σε προβατίνα υποομάδας Β3, στην οποία έγινε ευθανασία 11 ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό.



α. Έντονη πάχυνση και ερυθρότητα του βλεννογόνου του θηλαίου κόλπου.



β. Συναθροίσεις ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου (Χ50, χρώση Η&Ε).



γ. Εστιακή διήθηση από λεμφοκύτταρα στο μαστικό παρέγχυμα (Χ100, χρώση Η&Ε).

Εικόνα III.4. Ιστοπαθολογικά ευρήματα σε προβατίνα υποομάδας B2, στην οποία έγινε ευθανασία 7 ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό.



α. Συνάθροιση ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων με βλαστική δραστηριότητα στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου (Χ50, χρώση Η&Ε).

β. Συνάθροιση ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων με βλαστική δραστηριότητα στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου (εικονίδιο α) (Χ200, χρώση Η&Ε).

Εικόνα III.5. Ιστοπαθολογικά ευρήματα σε προβατίνα υποομάδας B3, στην οποία έγινε ευθανασία 11 ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό.

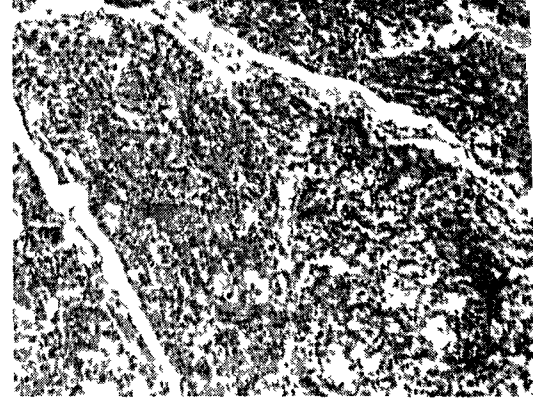


Συνάθροιση λεμφοκυττάρων με βλαστική δραστηριότητα στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου (Χ200, χρώση Η&Ε).

Εικόνα III.6. Ιστοπαθολογικά ευρήματα σε προβατίνα υποομάδας Β4, στην οποία έγινε ευθανασία 7 ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό.

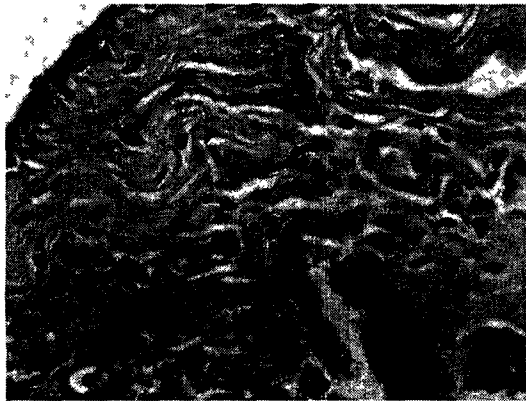


α. Λεμφοκυτταρική διήθηση στο θηλαίο πόρο (Χ100, χρώση Η&Ε).



β. Λευκοκυτταρική διήθηση (ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα και λεμφοκύτταρα) καταστροφή των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων, εξαγγείωση και καταστροφή επιθηλιακών κυττάρων και αδενοκυψελίδων στο μαστικό παρέγχυμα (Χ200, χρώση Η&Ε)

Εικόνα III.7. Ιστοπαθολογικά ευρήματα σε προβατίνα υποομάδας Α4, στην οποία έγινε ευθανασία 11 ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό.



Υποβλεννογόνια λευκοκυτταρική διήθηση (λεμφοκύτταρα, πλασμοκύτταρα) στο θηλαίο κόλπο (Χ400, χρώση Η&Ε)

Σύγκριση ευρημάτων στις ενοφθαλμισμένες θηλές

Βακτηριολογικά και κυτταρολογικά ευρήματα

Κανένα από τα δύο βακτηριακά στελέχη (ES27L, VSM08L) που χρησιμοποιήθηκαν στον πειραματισμό, δε συσχετίστηκε με περισσότερα θετικά βακτηριολογικά ή κυτταρολογικά αποτελέσματα. Όσον αφορά στο υλικό από το θηλαίο πόρο και το μαστικό έκκριμα (συνδυασμένα), τα θετικά αποτελέσματα της βακτηριολογικής εξέτασης ήταν 64% και 78%

αντίστοιχα. Όσον αφορά στα ιστοτεμάχια, τα θετικά αποτελέσματα της βακτηριολογικής εξέτασης ήταν 56% και 61% αντίστοιχα. Επιπλέον, τα θετικά αποτελέσματα της δοκιμής CM ήταν 64% και 60% αντίστοιχα.

Στα ζώα των υποομάδων A2/B2 βρέθηκαν λιγότερα βακτηριολογικά ή κυτταρολογικά θετικά αποτελέσματα από τα ζώα των υποομάδων A3/B3 και A4/B4. Όσον αφορά στο υλικό από το θηλαίο πόρο και το μαστικό έκκριμα (συνδυασμένα), τα θετικά αποτελέσματα της βακτηριολογικής εξέτασης ήταν 37%, 74% και 79% αντίστοιχα (Πίνακας III.iii). Όσον αφορά στα ιστοτεμάχια, τα θετικά αποτελέσματα της βακτηριολογικής εξέτασης ήταν 33%, 75% και 67% αντίστοιχα (Πίνακας III.iv). Επιπλέον, τα θετικά αποτελέσματα της δοκιμής CMT ήταν 52%, 85% και 75% αντίστοιχα (Πίνακας III.iii).

Παθολογοανατομικά ευρήματα

Στον Πίνακα III.v παρουσιάζεται αναλυτικά η βαθμολογική αξιολόγηση των παθολογοανατομικών ευρημάτων. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι δεν υπάρχει διαφορά στη συνολική κλίμακα βαθμολόγησης των παθολογοανατομικών ευρημάτων στις θηλές ανάλογα με το στέλεχος με το οποίο ενοφθαλμίστηκαν. Το άθροισμα όλων των βαθμών αξιολόγησης των ευρημάτων στις θηλές ήταν 53 για το στέλεχος ES26L και 54 για το στέλεχος VSM08L. Αν και παρατηρήθηκε μία τάση αύξησης των βαθμών στις ημέρες D7 και D11, αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

Επίσης, δεν υπήρχε διαφορά στη συνολική κλίμακα βαθμολογικής αξιολόγησης των ευρημάτων ανάλογα με τη μέθοδο ενοφθαλμισμού (υποομάδα A2/B2, A3/B3, A4/B4 [$P=0,180$], ή μεταξύ των βαθμών της μακροσκοπικής και ιστολογικής εξέτασης ($P=0,058$).

Όμως, οι βαθμοί αξιολόγησης για κάθε ημέρα ευθανασίας, καθώς και για κάθε μέθοδο ενοφθαλμισμού ήταν στατιστικά διαφορετικοί από το μηδέν, δηλαδή από τη βαθμολογική αξιολόγηση των μη ενοφθαλμισμένων θηλών ($P=0,036$).

Πίνακας III.v. Σύνολο βαθμολογικής αξιολόγησης των παθολογοανατομικών ευρημάτων στις θηλές προβάτων που είχαν ενοφθαλμιστεί με *M. haemolytica*.

Υποομάδα	Ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό (ημέρα ευθανασίας)			
	D2	D4	D7	D11
A2	4	1	5	7
A3	4	1	7	6
A4	6	3	4	5
B2	3	4	3	6
B3	5	4	6	8
B4	2	3	5	5

ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV

ΚΛΙΝΙΚΑ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΑ ΠΑΘΗΣΕΩΝ ΘΗΛΩΝ ΣΕ ΠΡΟΒΑΤΑ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στις αγελάδες έχει περιγραφεί μία ποικιλία παθολογικών καταστάσεων στις θηλές τους, οι οποίες μπορούν να καταταγούν σε κατηγορίες με βάση διάφορα κριτήρια.

Συχνά, οι αλλοιώσεις είναι το αποτέλεσμα τραυματισμού και εκδηλώνονται ως εγκάρσια ή επιμήκη, διαπυραίνοντα ή μη τραύματα, συνηθέστερα από σύρματα (π.χ. σε φράκτες) ή απασυμπίεση μεταξύ της χηλής άλλης αγελάδας και του δαπέδου (Oltenucu, Bendixen, Vilson & Ekesbo 1990, Bramley 1992).

Η διαδικασία της άρμεξης (εφόσον πραγματοποιείται με λανθασμένη μεθοδολογία προκαλεί επίσης συχνές και σοβαρές αλλοιώσεις στις θηλές των αγελάδων (Bramley 1992). Οι τέτοιου είδους παθολογικές καταστάσεις έχουν περιγραφεί υποδόριες αιμορραγίες γύρω από το στόμιο της θηλής, διάταση του στομίου, πρόπτωση ή ρήξη του βλεννογόνου του θηλαίου πόροι και "σκασίματα" (αλλοιώσεις τύπου "chapping") του δέρματος της θηλής (Witzig και συν. 1984 Agger & Hesselholt 1986, Bramley 1992). Οι Fox και Hancock (1989) και οι Fox και Norell (1994) ανέφεραν τη δημιουργία αλλοιώσεων τύπου "chapping" στο δέρμα της θηλής και ως αποτέλεσμα έκθεσης των ζώων σε χαμηλή θερμοκρασία ή έντονους ανέμους.

Συχνές αλλοίωση είναι η εξέλκωση του στομίου ή του δέρματος του κατώτερου τμήματος της θηλής, ως αποτέλεσμα χρήσης συμπυκνωμένου διαλύματος απολυμαντικού (Bramley 1992). Στη βιβλιογραφία περιγράφονται επίσης περιπτώσεις υπεράριθμων θηλών, θηλών οι οποίες κλείνουν ατελώς με αποτέλεσμα τη συνεχή ροή μαστικού εκκρίματος, καθώς και υποδόρια αιματώματα θηλών (Vlaminck & Steenhaut 1995). Οι Steenhaut και Vlaminck (1995) ανέφεραν επίσης περιστατικά συριγγίων σε θηλές αγελάδων. Σπανιότερα αναφέρονται περιστατικά παρασιτώσεων θηλών, για παράδειγμα από προνύμφες *Onchocerca* (Beytut, Akca & Bain 2005) ή από παράσιτα του γένους *Stefanofilaria* (Bakken 1980) ή από προνύμφες μυγών του γένους *Calliphora* (Bramley 1992).

Οι αλλοιώσεις των θηλών μπορεί επίσης να είναι μία εκδήλωση κάποιας ασθένειας ανοσογενούς αιτιολογίας. Σε αυτήν την κατηγορία έχουν περιγραφεί αλλοιώσεις ως αποτέλεσμα ευλογιάς, ψευδοευλογιάς, φουσαλιδώδους στοματίτιδας, αφθώδους πυρετού, θηλωμάτωσης ή μόλυνσης από βόειο ερπητοϊό-2 (Wellenberg, Van Der Poel & Van Oirschot 2002). Σε αυτήν την περίπτωση οι αλλοιώσεις συνήθως εμφανίζονται σε αρκετά ζώα στην εκτροφή (Radostiits και συν. 2000, Petrovski 2005).

Γενικά, οι αλλοιώσεις εντοπίζονται στο σώμα της θηλής ή στο κατώτερο τμήμα της ή γύρω από το στόμιο ή στους υποδόριους ιστούς ή στο βλεννογόνο της θηλής (Hospes & Seeh 1998, Seeh, Melle, Medl & Hospes 1998).

Ιδιαίτερης σημασίας αποτελεί η στένωση της θηλής, η οποία συνήθως εκδηλώνεται ως συνέπεια κάποιας άλλης πάθησής της. Στένωση της θηλής μπορούν να προκαλέσουν εκβλαστήσεις στο βλεννογόνο του θηλαίου πόρου ή του θηλαίου κόλπου (Hospes & Seeh 1998), χρόνια υπερπλαστική φλεγμονή στο εσωτερικό της θηλής (Hospes & Seeh 1998), ξένα σώματα στον αυλό της θηλής ή αλλοιώσεις χρόνιας φλεγμονής (Seeh και συν. 1998). Η στένωση της θηλής μπορεί να καταλήξει και σε πλήρη έμφραξή της. Επίσης έχει αναφερθεί στένωση θηλής συγγενούς αιτιολογίας (Alacam, Dinc, Guler & Elma 1990)

Στις προβατίνες αναφέρονται συνηθέστερα αλλοιώσεις της θηλής, από λοιμώδεις ασθένειες (για παράδειγμα: λοιμώδης έκθυμα, αφθώδης πυρετός), από την αρμεκτική μηχανή τα δόντια αμνών ή, τέλος, κατά την κουρά των ζώων (Gunning & Bosworth 1989, Quinney και συν. 2003). Σε περιπτώσεις τραυματισμού των θηλών συχνά αναπτύσσεται στένωση του αυλού της θηλής, εξαιτίας δημιουργίας σκληρού σχηματισμού κατά μήκος της θηλής ή σκληροδακτυλίου στο άκρο της, με αποτέλεσμα η άρμεξη των ζώων να γίνεται με δυσκολία (Mavrogianni, Fthenakis, Burriel, Gouletsou, Papaioannou & Taitzoglou 2004).

Άλλη παθολογική κατάσταση είναι η φλυκταινώδης δερματίτιδα του δέρματος του μαστού και των θηλών, η οποία οφείλεται στο *Staphylococcus aureus*. Η ασθένεια εκδηλώνεται με χαρακτηριστική δυσφορία στα ζώα, πιθανόν δε προδιαθέτει σε σταφυλοκοκκική μαστίτιδα. Οι δερματικές αλλοιώσεις περιγράφονται ως φλύκταινες διαμέτρου 2 έως 4 mm και σπανιότερα ως δοθιήνες και εντοπίζονται στο άτριχο τμήμα του δέρματος του μαστού και στη βάση των θηλών (Scott & Murphy 1997, Martin 2001, Plant 2001, Hajtos, Glavits, Kovacs, Palfi & Makrai 2000).

Παρατηρείται επίσης δερματίτιδα ως εκδήλωση της ευλογιάς. Η ασθένεια προκαλείται από τον ιό της ευλογιάς των προβάτων (ιός του γένους *Capripoxvirus* της οικογένειας Poxviridae), ο οποίος προσβάλλει μόνον πρόβατα. Στις προβατίνες εκδηλώνεται συνήθως ως ασθένεια ελαφράς μορφής, με δερματικές αλλοιώσεις κάτω από την ουρά και στο δέρμα του μαστού και με θνησιμότητα έως 5%. Οι δερματικές αλλοιώσεις συνίστανται σε κηλίδες και κυκλικές βλατίδες, που εξελίσσονται σε φυσαλίδες με οροαιμορραγικό εξίδρωμα, οι οποίες καταλήγουν σε φλύκταινες και εφελκίδες με καταστροφή της βασικής στιβάδας του δέρματος (Kitching 2001).

Τέλος, σημαντική πάθηση αποτελεί και το λοιμώδες έκθυμα. Η ασθένεια προκαλείται από τον ιό του λοιμώδους εκθύματος (ιός του γένους *Parapoxvirus*), ο οποίος προσβάλλει πρόβατα και αίγες. Μετά από περίοδο επώασης δύο έως τριών ημερών, οι δερματικές αλλοιώσεις παρουσιάζονται ως βλατίδες και φλύκταινες στο δέρμα της θηλής και σπανιότερα του μαστού, μεταπίπτουν δε σε εφελκίδες, οι οποίες καλύπτουν μεγάλη έκταση φλεγμονής και εξέλκωσης (Reid 2001, Watson & Scholes 2005).

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται αναλυτικά τα κλινικά, κυτταρολογικά, μικροσκοπικά, νεκροτομικά, βακτηριολογικά και ιστοπαθολογικά ευρήματα σε δέκα κλινικά περιστατικά παθήσεων των θηλών σε προβατίνες.

B. ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΩΝ

Υλικά και Μέθοδοι

Κατά την εκπόνηση αυτής της διατριβής εξετάστηκαν δέκα προβατίνες με αλλοιώσεις στις θηλές τους. Τα ζώα αυτά είτε προσκομίστηκαν στην Κλινική Μαιευτικής και Αναπαραγωγής του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, είτε εξετάστηκαν σε κτηνοτροφικές εκμεταλλεύσεις μετά από πρόσκληση του ιδιοκτήτη. Κάποια από τα ζώα αγοράστηκαν και νοσηλεύτηκαν έως την ολοκλήρωση των κλινικών και παρακλινικών εξετάσεων. Στη συνέχεια έγινε ευθανασία και πραγματοποιήθηκε νεκροτομική εξέταση.

Τα κλινικά και παρακλινικά ευρήματα στα ζώα αυτά παρουσιάζονται παρακάτω. Κατά την περιγραφή των ευρημάτων δόθηκε ιδιαίτερη βαρύτητα στην περιγραφή των ευρημάτων στις θηλές των ζώων, όπου άλλωστε αφορά και η αναφερόμενη διάγνωση σε κάθε περιστατικό.

Κλινική εξέταση των ζώων

Η γενική κλινική εξέταση των ζώων και η κλινική εξέταση του μαστού πραγματοποιήθηκαν, όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο II, Τμήμα Β).

Παρακλινικές εξετάσεις

Δειγματοληψία

Σε κάθε ζώο πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία υλικού από το θηλαίο πόρο και μαστικό εκκρίματος. Η δειγματοληψία υλικού γινόταν όπως περιγράφηκε 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.

Σ' ένα περιστατικό (Αρ. 3), έγινε δειγματοληψία από το δέρμα του μαστού και των θηλών χρησιμοποιώντας αποστειρωμένο βαμβακοφόρο στείλεο, όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο III, Τμήμα Β). Επίσης, ελήφθησαν ξέσματα δέρματος με λεπίδα χειρουργικού νυστεριού και μικρό τεμάχιο δέρματος με μαχαιρίδιο (punch) βιοψίας (Jorgen Kruse A/S Marslev, Δανία) από το δέρμα του μαστού και των θηλών, χρησιμοποιώντας καθιερωμένες τεχνικές δειγματοληψίας (Fthenakis, Papadopoulos, Himonas, Leontides, Kritas & Papatsa 2000, Tontis, Doukas, Likotrafitis, Kritsepi-Konstantinou, Fthenakis, Damani 2005).

Σ' ένα περιστατικό (Αρ. 10), έγινε συλλογή εφελκίδων από το δέρμα της θηλής σε στείρο φιαλίδιο (Amilabo, Chassieu, Γαλλία) για εργαστηριακή εξέτασή τους.

Κυτταρολογική εξέταση

Σε κάθε δείγμα μαστικού εκκρίματος πραγματοποιήθηκε η δοκιμή CMT, όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο I, 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 μ τουλάχιστον "1" θεωρήθηκε ενδεικτική υποκλινικής μαστίτιδας (Fthenakis 1995).

Επιπλέον, παρασκευάζονταν επιχρίσματα από το μαστικό έκκριμα για χρώση Giemsa.

Παθολογοανατομική εξέταση

Σε όποια ζώα αγοράστηκαν, έγινε ευθανασία υπό γενική αναισθησία μετά τη ολοκλήρωση των κλινικών και παρακλινικών εξετάσεων. Σε κάθε ζώο πραγματοποιήθηκαν νεκροτομή και, εφαρμόζοντας συνθήκες άσηπτης δειγματοληψίας, ελήφθησαν δείγματα ιστών από το ήπαρ και τον σπλήνα του για βακτηριολογική εξέταση.

Στη συνέχεια, αφαιρέθηκε ο μαστός και έγινε λεπτομερής εξέταση του. Αρχικά, οι μαστικοί αδένες και οι θηλές εξετάστηκαν με επισκόπηση και ψηλαφήθηκαν σε όλη την έκτασή τους. Μετά, έγινε θηλεκτομή στη βάση κάθε θηλής. Η εξέταση των μαστικών αδένων και των θηλών έγινε όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο III, Τμήμα Β).

Κατά τη διάρκεια της εξέτασης λαμβάνονταν υπό άσηπτες συνθήκες δείγματα ιστού από το μαστικό παρέγχυμα και τα επιχώρια λεμφογάγγλια, καθώς και ξέσματα από το βλεννογόνο του θηλαίου πόρου και του θηλαίου κόλπου (Κεφάλαιο III, Τμήμα Β).

Τέλος, από κάθε μαστικό αδένα ελήφθησαν δείγματα παρεγχύματος και όλη η θηλή για ιστολογική εξέταση. Τα δείγματα συντηρήθηκαν και επεξεργάστηκαν όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο III, Τμήμα Β).

Βακτηριολογική εξέταση

Όλα τα δείγματα που συλλέχθηκαν: υλικό από το θηλαίο πόρο, δείγματα μαστικού εκκρίματος, βύσματα από τη δειγματοληψία του δέρματος, ξέσματα (στη χειρουργική λεπίδα) από το θηλαίο πόρο, ξέσματα (στη χειρουργική λεπίδα) από το θηλαίο κόλπο, δείγματα ιστών καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία με αιματούχο (5% πρόβειο αίμα) άγαρ Columbia, τα οποία επωάστηκαν σε αερόβιο περιβάλλον σε θερμοκρασία 37 °C έως 72 ώρες. Η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών που αναπτύχθηκαν, έγινε με τη χρήση καθιερωμένων βακτηριολογικών εξετάσεων (Barrow & Feltham 1993) και τις ταχείες δοκιμές API.

Παρασιτολογική εξέταση

Τα ξέσματα δέρματος και το ιστοτεμάχιο δέρματος (Περιστατικό Αρ. 3) επεξεργάστηκαν με καθιερωμένες παρασιτολογικές τεχνικές για την ανίχνευση ακάρεων σαρκοπτικής ψώρας (Fthenakis και συν. 2000, Tontis και συν. 2005).

Ιολογική εξέταση

Στις εφελκίδες από το δέρμα της θηλής (Περιστατικό Αρ. 10) πραγματοποιήθηκε ιολογική εξέταση, με "semi-nested" τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Σ αυτήν χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές PPP-1, PPP-4 και PPP-3 (MWG Biotech AG, Ebersberg Γερμανία), ώστε να ενισχυθεί ένα τμήμα του γονιδίου B2L του ιού του λοιμώδους εκθύματος.

Αποτελέσματα

Κλινικό περιστατικό Αρ. 1

Ιστορικό - Κλινικά ευρήματα

Το κλινικό περιστατικό αφορούσε σε προβατίνα ηλικίας 6 ετών, στην περίοδο άρμεξης, η οποία εξετάστηκε σε εκτροφή της περιοχής Καρδίτσας. Ο κτηνοτρόφος ανέφερε δυσκολία στην άρμεξη του ζώου.

Κατά την κλινική εξέταση παρατηρήθηκε ιδιαίτερα μεγάλο μέγεθος στις δύο θηλές. Συγκεκριμένα, η δεξιά θηλή είχε μήκος 6,0 cm και η διάμετρός της στη βάση και το κάτω άκρο ήταν 2,1 cm και 2,0 cm, αντίστοιχα (Εικόνα IV.1). Η αριστερή θηλή είχε μήκος 5,2 cm και η διάμετρός της στη βάση και το κάτω άκρο ήταν 2,1 cm. Η έξοδος του μαστικού εκκρίματος γινόταν χωρίς ιδιαίτερα προβλήματα. Δεν παρατηρήθηκαν παθολογικά ευρήματα στους μαστικούς αδένες.

Κυτταρολογικά ευρήματα

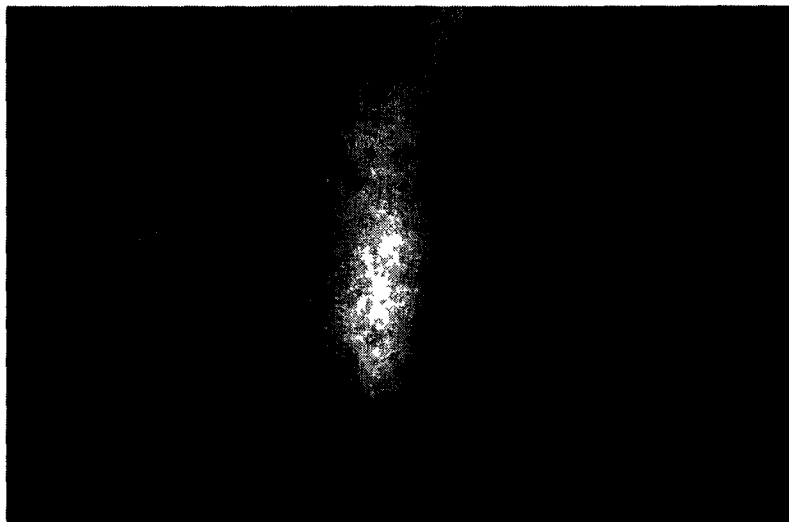
Η δοκιμή CMT ήταν θετική ("2") στα δείγματα και από τους δύο μαστικούς αδένες. Στα επιχρίσματα εκκρίματος και από τους δύο μαστικούς αδένες βρέθηκαν ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα (85%) και μακροφάγα (15%).

Βακτηριολογικά ευρήματα

Από το δείγμα υλικού από τους δύο θηλαίους πόρους και από το δείγμα μαστικού εκκρίματος από τους δύο μαστικούς αδένες απομονώθηκε *S. epidermidis*.

Διάγνωση

Υπερμεγέθεις θηλές.



Εικόνα IV.1. Υπερμεγέθεις θηλές της δεξιάς θηλής της προβατίνας στο κλινικό περιστατικό Αρ. 1

Κλινικό περιστατικό Αρ. 2

Ιστορικό - Κλινικά ευρήματα

Το κλινικό περιστατικό αφορούσε σε προβατίνα ηλικίας 5 ετών, στην περίοδο θηλασμού, η οποία εξετάστηκε σε εκτροφή της περιοχής της Καρδίτσας. Ο κτηνοτρόφος ανέφερε διογκώσεις σε μία θηλή.

Κατά την κλινική εξέταση παρατηρήθηκαν δύο οζίδια στην αριστερή θηλή και ένα στην δεξιά. Το ένα από τα οζίδια στην αριστερή θηλή είχε μορφή θηλώματος, ως μη μισχωτή οζώδης εκβλάστηση διαμέτρου 0,5 cm, ενώ το δεύτερο ήταν μικρού μεγέθους, εντοπιζόταν στον υποδόριο ιστό και προεξείχε ελαφρά από το δέρμα (Εικόνα IV.2.α,β). Το οζίδιο στη δεξιά θηλή ήταν υπεραιμικό και εντοπιζόταν στο μέσον της (Εικόνα IV.2.γ,δ). Στο δεξιό μαστικό παρέγχυμα ψηλαφήθηκε μικρής έκτασης σκλήρυνση, ενώ στο αριστερό δεν παρατηρήθηκε κάποιο παθολογικό εύρημα.

Κυτταρολογικά ευρήματα

Η δοκιμή CMT ήταν θετική ("2") στα δείγματα και από τους δύο μαστικούς αδένες. Στα επιχρίσματα εκκρίματος και από τους δύο μαστικούς αδένες βρέθηκαν ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα (70%) και λεμφοκύτταρα (30%).

Μακροσκοπικά νεκροτομικά ευρήματα

Τα δύο οζίδια στην αριστερή θηλή ήταν συμπαγή και δεν περιείχαν υλικό. Το μεγαλύτερο ήταν εξωτερικό, ενώ το μικρότερο εντοπιζόταν υποδόρια στο τοίχωμα της θηλής. Το οζίδιο στη δεξιά θηλή ήταν υπεραιμικό, συμπαγές χωρίς υλικό και εντοπιζόταν εξωτερικά.

Δεν παρατηρήθηκαν άλλα παθολογικά ευρήματα.

Βακτηριολογικά ευρήματα

Από το δείγμα υλικού από τον αριστερό θηλαίο πόρο, από το δείγμα εκκρίματος από το αριστερό μαστικό αδένα και από το αριστερό παρέγχυμα απομονώθηκε *S. simulans*. Από τα άλλα δείγματα δεν απομονώθηκαν βακτήρια.

Ιστοπαθολογικά ευρήματα

Αριστερή θηλή και σύστοιχος μαστικός αδένας

Παρατηρήθηκε υποβλεννογόνια διήθηση από ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα στο θηλαίο πόρο και από λεμφοκύτταρα στο θηλαίο κόλπο (Εικόνα IV.2.ε). Επίσης, παρατηρήθηκαν αρκετές συναθροίσεις λεμφοκυττάρων στο μαστικό παρέγχυμα (Εικόνα IV.2.στ).

Δεξιά θηλή και σύστοιχος μαστικός αδένας

Παρατηρήθηκε υποβλεννογόνια διήθηση από ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα στο θηλαίο πόρο και από ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα και λεμφοκύτταρα στο θηλαίο κόλπο (Εικόνα IV.2.ζ,η). Επίσης, παρατηρήθηκαν συναθροίσεις λεμφοκυττάρων και εστιακή καταστροφή αδενοκυψελίδων στο μαστικό παρέγχυμα.

Διάγνωση

Πιθανή θηλωμάτωση και υποδόριο οζίδιο άγνωστης αιτιολογίας.

Εικόνα IV.2. Ευρήματα στο κλινικό περιστατικό Αρ. 2.



α. Δύο οζίδια στην αριστερή θηλή της προβατίνας.

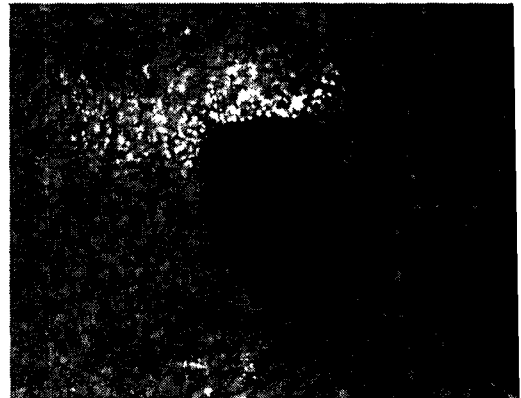


β. Δύο οζίδια στην αριστερή θηλή της προβατίνας.

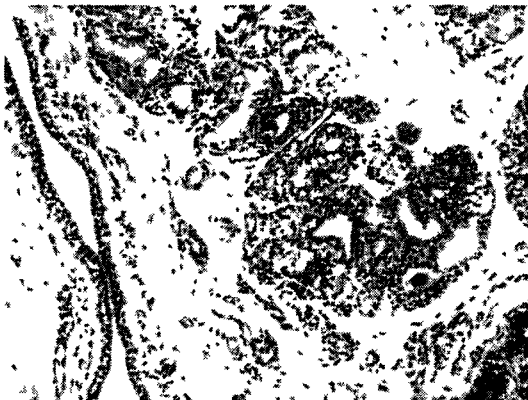
Εικόνα IV.2. Ευρήματα στο κλινικό περιστατικό Αρ. 2 (συνέχεια).



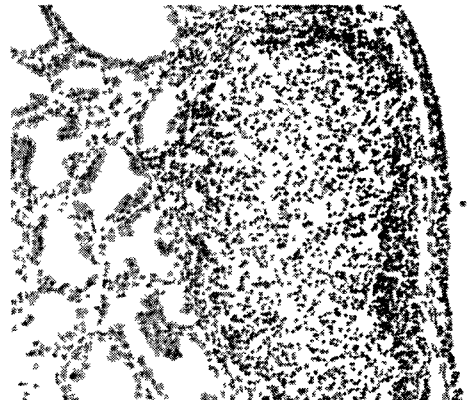
γ. Οζίδιο στη δεξιά θηλή της προβατίνας.



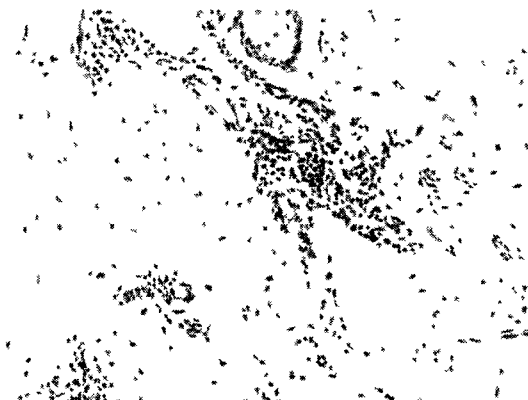
δ. Οζίδιο στη δεξιά θηλή της προβατίνας.



ε. Υποβλεννογόνια διήθηση από λεμφοκύτταρα στον αριστερό θηλαίο κόλπο (Χ100, χρώση Η&Ε).



στ. Συνάθροιση λεμφοκυττάρων στο αριστερό μαστικό παρέγχυμα (Χ100, χρώση Η&Ε)



ζ. Διήθηση από λεμφοκύτταρα στο δεξιό θηλαίο πόρο (Χ100, χρώση Η&Ε).



η. Διήθηση από λεμφοκύτταρα στο δεξιό θηλαίο κόλπο (Χ50, χρώση Η&Ε).

Κλινικό περιστατικό Αρ. 3

Ιστορικό - Κλινικά ευρήματα

Το κλινικό περιστατικό αφορούσε σε προβατίνα ηλικίας 6 ετών, στη περίοδο θηλασμού η οποία προσκομίστηκε στην Κλινική. Ο κτηνοτρόφος ανέφερε αλλοιώσεις στο δέρμα του μαστού και των θηλών.

Κατά την κλινική εξέταση εντοπίστηκε εκτεταμένη και διάχυτη δερματίτιδα και υπερκεράτωση στο δέρμα του μαστού και των δύο θηλών (Εικόνα IV.3.α). Σε κάποια σημεία ιδιαίτερα στο άτριχο τμήμα του δέρματος, παρατηρήθηκαν φλύκταινες με διάμετρο 2 έως 2,5 cm. Κατά τόπους το δέρμα ήταν παχυμένο και εμφάνιζε κερατινοποίηση. Στο σώμα της αριστερής θηλής παρατηρήθηκε ένα οζίδιο (Εικόνα IV.3.β). Το δέρμα της δεξιάς θηλής ήταν παχυμένο και παρουσίαζε μικρές διογκώσεις (Εικόνα IV.3.γ). Δεν παρατηρήθηκαν παθολογικά ευρήματα στους μαστικούς αδένες.

Κυτταρολογικά ευρήματα

Η δοκιμή CMT ήταν θετική στα δείγματα και από τους δύο μαστικούς αδένες (αριστερός "1", δεξιός: "3"). Στα επιχρίσματα εκκρίματος και από τους δύο μαστικούς αδένες βρέθηκαν ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα (50%) και μακροφάγα (50%).

Παρασιτολογικά ευρήματα

Δεν ανιχνεύτηκαν παρασιτικά στοιχεία στα ξέσματα και στο ιστοτεμάχιο δέρματος.

Μακροσκοπικά νεκροτομικά ευρήματα

Το οζίδιο στην αριστερή θηλή ήταν συμπαγές και δεν περιείχε υλικό, εντοπιζόταν δε εξωτερικά.

Δεν παρατηρήθηκαν άλλα παθολογικά ευρήματα.

Βακτηριολογικά ευρήματα

Από τα δείγματα από το δέρμα του μαστού και των θηλών απομονώθηκε σε καθαρή καλλιέργεια *S. aureus*. Από τα άλλα δείγματα δεν απομονώθηκαν βακτήρια.

Ιστοπαθολογικά ευρήματα

Αριστερή θηλή και σύστοιχος μαστικός αδένας

Παρατηρήθηκε υποβλεννογόνια διήθηση από λεμφοκύτταρα στο θηλαίο πόρο και στο θηλαίο κόλπο (Εικόνα IV.3.δ).

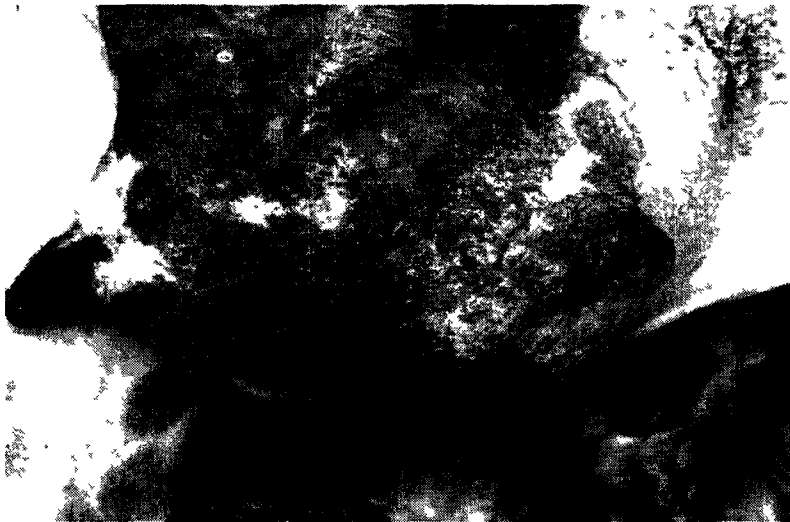
Δεξιά θηλή και σύστοιχος μαστικός αδένας

Παρατηρήθηκε υποβλεννογόνια διήθηση από ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα στο θηλαίο πόρο (Εικόνα IV.3.ε) και από ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα και λεμφοκύτταρα στο θηλαίο κόλπο (Εικόνα IV.3.στ), καθώς και περιοχή συνάθροισης λεμφοκυττάρων με εικόνα χαρακτηριστική λεμφοζιδίου, με ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα και βλαστική δραστηριότητα στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου. Επίσης, παρατηρήθηκαν έντονη διήθηση από λεμφοκύτταρα και γενικευμένη καταστροφή των αδενοκυψελίδων στο μαστικό παρέγχυμα (Εικόνα IV.3.ζ).

Διάγνωση

Σταφυλοκοκκική δερματίτιδα στο δέρμα του μαστού και των θηλών.

Εικόνα IV.3. Ευρήματα στο κλινικό περιστατικό Αρ. 3.



α. Εκτεταμένη και διάχυτη δερματίτιδα στο δέρμα του μαστού και των θηλών.



β. Οζίδιο στο σώμα της αριστερής θηλής

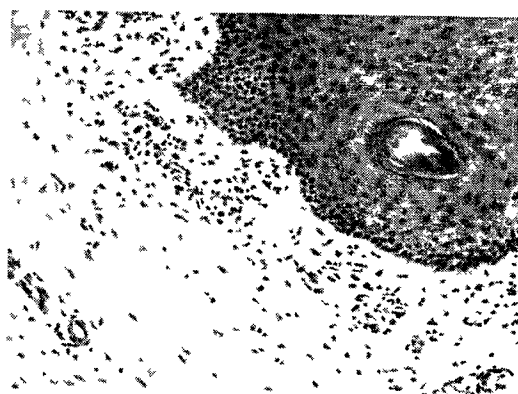


γ. Παχυμένο δέρμα και μικρές διογκώσεις στη δεξιά θηλή.

Εικόνα IV.3. Ευρήματα στο κλινικό περιστατικό Αρ. 3 (συνέχεια).



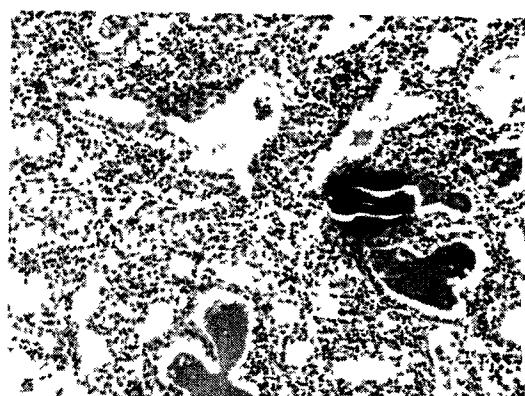
δ. Υποβλεννογόνια διήθηση από λεμφοκύτταρα στον αριστερό θηλαίο κόλπο (Χ100, χρώση Η&Ε).



ε. Υποβλεννογόνια διήθηση στο δεξιό θηλαίο κόλπο (Χ100, χρώση Η&Ε).



στ. Υποβλεννογόνια διήθηση από λεμφοκύτταρα στο δεξιό θηλαίο πόρο (Χ100, χρώση Η&Ε).



ζ. Διήθηση από λεμφοκύτταρα και καταστροφή αδενοκυψελίδων στο δεξιό μαστικό παρέγχυμα (Χ100, χρώση Η&Ε).

Κλινικό περιστατικό Αρ. 4

Ιστορικό - Κλινικά ευρήματα

Το κλινικό περιστατικό αφορούσε σε προβατίνα ηλικίας 5 ετών, στην περίοδο θηλασμού η οποία προσκομίστηκε στην Κλινική. Ο κτηνοτρόφος ανέφερε αλλοιώσεις στις θηλές.

Κατά την κλινική εξέταση παρατηρήθηκαν ένα οζίδιο στο μέσον της αριστερής θηλής (Εικόνα IV.4.α,β) και ένα οζίδιο στο μέσον της δεξιάς (Εικόνα IV.4.γ). Δεν παρατηρήθηκαν παθολογικά ευρήματα στους μαστικούς αδένες.

Κυτταρολογικά ευρήματα

Η δοκιμή CMT ήταν θετική στα δείγματα και από τους δύο μαστικούς αδένες ("1"). Στα επιχρίσματα εκκρίματος και από τους δύο μαστικούς αδένες βρέθηκαν ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα (90%) και λεμφοκύτταρα (10%).

Μακροσκοπικά νεκροτομικά ευρήματα

Το οζίδιο στην αριστερή θηλή ήταν συμπαγές και δεν περιείχε υλικό. Το οζίδιο στη δεξιά θηλή περιείχε πυώδες υλικό (Εικόνα IV.4.δ). Και τα δύο εντοπίζονταν στο τοίχωμα της θηλής.

Δεν παρατηρήθηκαν άλλα παθολογικά ευρήματα.

Βακτηριολογικά ευρήματα

Από το πυώδες υλικό του οζιδίου στη δεξιά θηλή απομονώθηκε *S. aureus*. Από τα άλλα δείγματα δεν απομονώθηκαν βακτήρια.

Ιστοπαθολογικά ευρήματα

Αριστερή θηλή και σύστοιχος μαστικός αδένας

Παρατηρήθηκε ήπια διήθηση από λεμφοκύτταρα στο θηλαίο κόλπο (Εικόνα IV.4.ε) και στο μαστικό παρέγχυμα, ιδιαίτερα δε γύρω από τις αδενοκυψελίδες (Εικόνα IV.4.στ).

Δεξιά θηλή και σύστοιχος μαστικός αδένας

Δεν παρατηρήθηκαν παθολογικά ευρήματα.

Διάγνωση

Υποδόρια οζίδια στις θηλές (πιθανόν ως αποτέλεσμα δαγκωμάτων από τους αμνοκύτταρα κατά το θηλασμό).

Εικόνα IV.4. Ευρήματα στο κλινικό περιστατικό Αρ. 4.

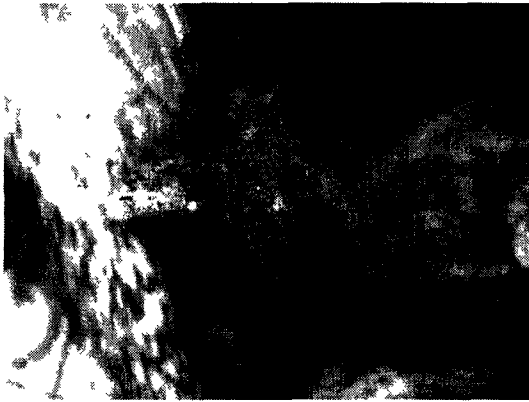


α. Οζίδιο στην αριστερή θηλή.



β. Οζίδιο στην αριστερή θηλή.

Εικόνα IV.4. Ευρήματα στο κλινικό περιστατικό Αρ. 4 (συνέχεια).



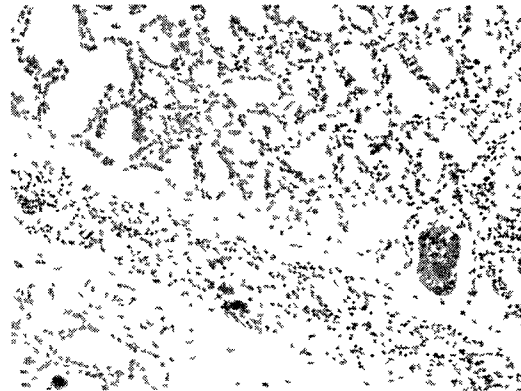
γ. Οζίδιο στη δεξιά θηλή.



δ. Οζίδιο με πυώδες υλικό στη δεξιά θηλή.



ε. Διήθηση από λεμφοκύτταρα στον αριστερό θηλαίο κόλπο (Χ50, χρώση Η&Ε).



στ. Διήθηση από λεμφοκύτταρα στο αριστερό μαστικό παρέγχυμα γύρω από τις αδενοκυψελίδες (Χ100, χρώση Η&Ε).

Κλινικό περιστατικό Αρ. 5

Ιστορικό - Κλινικά ευρήματα

Το κλινικό περιστατικό αφορούσε σε προβατίνα ηλικίας 5 ετών, στην περίοδο θηλασμού η οποία εξετάστηκε σε εκτροφή της περιοχής της Καρδίτσας. Ο κτηνοτρόφος ανέφερε διόγκωση σε μία θηλή.

Κατά την κλινική εξέταση εντοπίστηκε ένα απόστημα στο κάτω άκρο της δεξιάς θηλής (Εικόνα IV.5.α,β). Δεν παρατηρήθηκαν παθολογικά ευρήματα στην άλλη θηλή και στους μαστικούς αδένες.

Κυτταρολογικά ευρήματα

Η δοκιμή CMT ήταν θετική στο δείγμα από το δεξιό μαστικό αδένα ("2"). Στα επιχρίσματα εκκρίματος από το δεξιό μαστικό αδένα βρέθηκαν πολλά ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα (80%) και μακροφάγα (20%).

Μακροσκοπικά νεκροτομικά ευρήματα

Στο κάτω άκρο της δεξιάς θηλής υπήρχε υποδόριο (από το βλεννογόνο του θηλαϊκού πόρου έως την επιδερμίδα) απόστημα.

Δεν παρατηρήθηκαν άλλα παθολογικά ευρήματα.

Βακτηριολογικά ευρήματα

Από το δείγμα υλικού από το δεξιό θηλαίο πόρο, από το δείγμα εκκρίματος από το δεξιό μαστικό αδένα και από το δεξιό παρέγχυμα, καθώς και από το πυώδες υλικό του αποστήματος απομονώθηκε *M. haemolytica*. Από τα άλλα δείγματα δεν απομονώθηκαν βακτήρια.

Ιστοπαθολογικά ευρήματα

Αριστερή θηλή και σύστοιχος μαστικός αδένας

Δεν παρατηρήθηκαν παθολογικά ευρήματα.

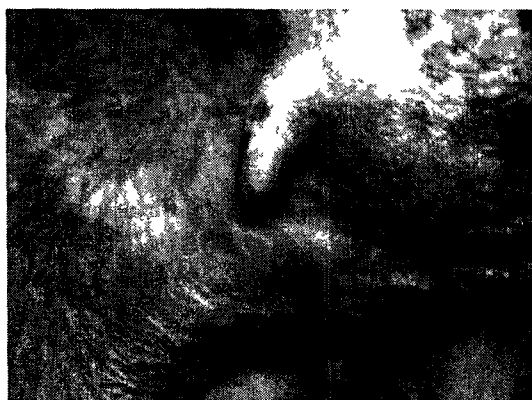
Δεξιά θηλή και σύστοιχος μαστικός αδένας

Παρατηρήθηκε διήθηση από λεμφοκύτταρα στο όριο μεταξύ θηλαϊκού πόρου και θηλαϊκού κόλπου και στο θηλαίο κόλπο (Εικόνα IV.5.γ). Παρατηρήθηκε μικρής έκτασης καταστροφική αδενοκυψελίδων στο μαστικό παρέγχυμα (Εικόνα IV.5.δ).

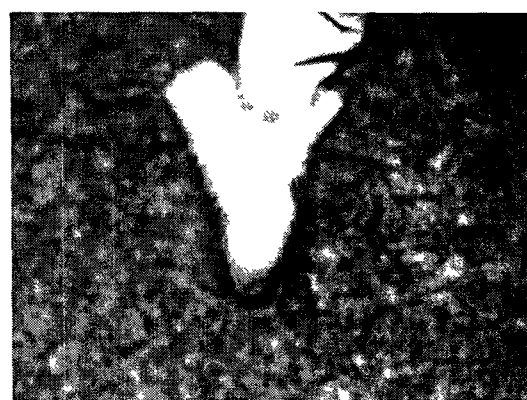
Διάγνωση

Υποδόριο απόστημα στη θηλή (πιθανόν ως αποτέλεσμα δαγκωμάτων από τους αμνοειδείς κατά το θηλασμό).

Εικόνα IV.5. Ευρήματα στο κλινικό περιστατικό Αρ. 5.



α. Απόστημα στο κάτω άκρο της δεξιάς θηλής.

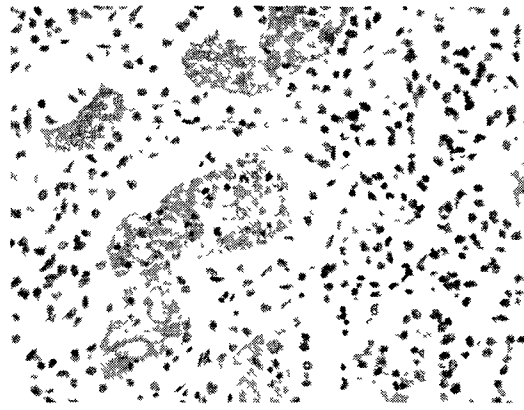


β. Απόστημα στο κάτω άκρο της δεξιάς θηλής.

Εικόνα IV.5. Ευρήματα στο κλινικό περιστατικό Αρ. 5 (συνέχεια).



γ. Διήθηση από λεμφοκύτταρα στο όριο μεταξύ δεξιού θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου (Χ100, χρώση Η&Ε).



δ. Καταστροφή αδενοκυψελίδων στο δεξιό μαστικό παρέγχυμα (Χ200, χρώση Η&Ε).

Κλινικό περιστατικό Αρ. 6

Ιστορικό - Κλινικά ευρήματα

Το κλινικό περιστατικό αφορούσε σε προβατίνα ηλικίας 4 ετών, στην περίοδο θηλασμού η οποία εξετάστηκε σε εκτροφή της περιοχής της Καρδίτσας. Ο κτηνοτρόφος ανέφερε διόγκωση σε μία θηλή.

Κατά την κλινική εξέταση παρατηρήθηκαν τραυματισμοί στο σώμα και των δύο θηλών (Εικόνα IV.6). Δεν παρατηρήθηκαν παθολογικά ευρήματα στους μαστικούς αδένες.

Κυτταρολογικά ευρήματα

Η δοκιμή CMT ήταν θετική στα δείγματα και από τους δύο μαστικούς αδένες (αριστερός "1", δεξιός: "2"). Στα επιχρίσματα εκκρίματος και από τους δύο μαστικούς αδένες βρέθηκαν ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα (100%).

Βακτηριολογικά ευρήματα

Από το δείγμα υλικού από το δεξιό θηλαίο πόρο απομονώθηκε *M. haemolytica*. Από τα άλλα δείγματα δεν απομονώθηκαν βακτήρια.

Διάγνωση

Τραυματισμοί του σώματος της θηλής (πιθανόν ως αποτέλεσμα δαγκωμάτων από τους αμνούς κατά το θηλασμό).



Εικόνα IV.6
Τραυματισμός στο σώμα
της αριστερής θηλής.

Κλινικό περιστατικό Αρ. 7

Ιστορικό - Κλινικά ευρήματα

Το κλινικό περιστατικό αφορούσε σε προβατίνα ηλικίας 4 ετών, στην περίοδο θηλασμού η οποία εξετάστηκε σε εκτροφή της περιοχής Καρδίτσας. Ο κτηνοτρόφος ανέφερε ότι το ζώο δεν επέτρεπε το θηλασμό από τους αμνούς του.

Κατά την κλινική εξέταση παρατηρήθηκαν τραυματισμοί στο σώμα της αριστερής θηλής (Εικόνα IV.7). Δεν παρατηρήθηκαν παθολογικά ευρήματα στην άλλη θηλή και στους μαστικούς αδένες.

Κυτταρολογικά ευρήματα

Η δοκιμή CMT ήταν θετική στα δείγματα και από τους δύο μαστικούς αδένες ("2"). Στα επιχρίσματα εκκρίματος και από τους δύο μαστικούς αδένες βρέθηκαν ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα (85%) και λεμφοκύτταρα (15%).

Βακτηριολογικά ευρήματα

Από το δείγμα υλικού από τον αριστερό θηλαίο πόρο απομονώθηκε *M. haemolytica*. Από τα άλλα δείγματα δεν απομονώθηκαν βακτήρια.

Διάγνωση

Τραυματισμοί του σώματος της θηλής (πιθανόν ως αποτέλεσμα δαγκωμάτων από τους αμνούς κατά το θηλασμό).



Εικόνα IV.7. Τραυματισμός στο σώμα της αριστερής θηλής.

Κλινικό περιστατικό Αρ. 8

Ιστορικό - Κλινικά ευρήματα

Το κλινικό περιστατικό αφορούσε σε προβατίνα ηλικίας 5 ετών, στην περίοδο θηλασμού η οποία εξετάστηκε σε εκτροφή της περιοχής της Καρδίτσας. Ο κτηνοτρόφος ανέφερε ότι παρατήρησε μορφώματα στις θηλές του ζώου.

Κατά την κλινική εξέταση παρατηρήθηκαν μορφώματα (δύο στην αριστερή θηλή και δύο στη δεξιά) ως μισχωτές εκβλαστήσεις διαμέτρου 0,3 έως 0,5 cm στη βάση κάθε θηλής (Εικόνα IV.8.α,β). Δεν παρατηρήθηκαν παθολογικά ευρήματα στους μαστικούς αδένες.

Κυτταρολογικά ευρήματα

Η δοκιμή CMT ήταν αρνητική στα δείγματα και από τους δύο μαστικούς αδένες. Στα επιχρίσματα εκκρίματος από το δεξιό μαστικό αδένα βρέθηκαν λίγα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα και σε αυτά από τον αριστερό μαστικό αδένα βρέθηκαν λίγα μακροφάγα.

Μακροσκοπικά νεκροτομικά ευρήματα

Τα μορφώματα στις θηλές ήταν συμπαγή και δεν περιείχαν υλικό, εντοπιζόνταν δε εξωτερικά.

Δεν παρατηρήθηκαν άλλα παθολογικά ευρήματα.

Βακτηριολογικά ευρήματα

Από το δείγμα υλικού από το δεξιό θηλαίο πόρο απομονώθηκε *S. epidermidis*. Από τα άλλα δείγματα δεν απομονώθηκαν βακτήρια.

Ιστοπαθολογικά ευρήματα

Αριστερή θηλή και σύστοιχος μαστικός αδένας

Παρατηρήθηκαν υποβλεννογόνια διήθηση λεμφοκυττάρων στο θηλαίο πόρο και το θηλαίο κόλπο, καθώς και συναθροίσεις λεμφοκυττάρων και εστιακή καταστροφή αδενοκυψελίδων στο μαστικό παρέγχυμα (Εικόνα IV.8 δ).

Δεξιά θηλή και δεξιό μαστικό παρέγχυμα

Παρατηρήθηκαν ήπια διήθηση από λεμφοκύτταρα και καταστροφή αδενοκυψελίδων στο μαστικό παρέγχυμα.

Διάγνωση

Πιθανή θηλωμάτωση.

Εικόνα IV.8. Ευρήματα στο κλινικό περιστατικό Αρ. 8



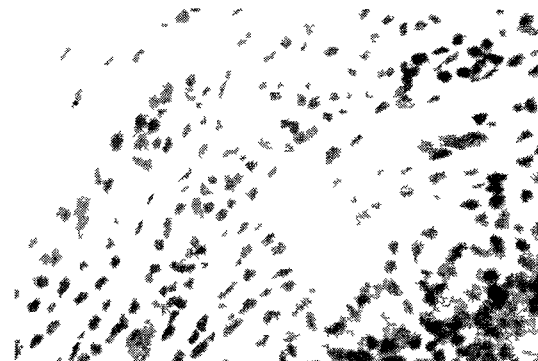
α. Μισχρωτές εκβλαστήσεις στη βάση της αριστερής θηλής



β. Μισχρωτή εκβλάστηση στη βάση της αριστερής θηλής



γ. Κατεστραμμένος θύλακας τρίχας και υποβλεννογόνια διήθηση λεμφοκυττάρων στον αριστερό θηλαίο πόρο (X100, χρώση Η&Ε).



δ. Συναθροίσεις λεμφοκυττάρων στο αριστερό μαστικό παρέγχυμα (εικονίδιο γ) (X400, χρώση Η&Ε)

Κλινικό περιστατικό Αρ. 9

Ιστορικό - Κλινικά ευρήματα

Το κλινικό περιστατικό αφορούσε σε προβατίνα ηλικίας 5 ετών, στην περίοδο άρμεξης, η οποία εξετάστηκε σε εκτροφή της περιοχής της Καρδίτσας. Ο κτηνοτρόφος ανέφερε δυσκολία στην άρμεξη του ζώου.

Κατά την κλινική εξέταση παρατηρήθηκε έντονη πάχυνση του τοιχώματος και των δύο θηλών (Εικόνα IV.9.α). Δεν παρατηρήθηκαν παθολογικά ευρήματα στους μαστικούς αδένες.

Κυτταρολογικά ευρήματα

Η δοκιμή CMT ήταν αρνητική στα δείγματα και από τους δύο μαστικούς αδένες. Στα επιχρίσματα εκκρίματος δε βρέθηκαν λευκοκύτταρα.

Μακροσκοπικά νεκροτομικά ευρήματα

Παρατηρήθηκε έντονη πάχυνση του βλεννογόνου του θηλαίου πόρου και του θηλαίου κόλπου και στις δύο θηλές. Όμως, υπήρχε σαφής διαχωρισμός του θηλαίου πόρου από το θηλαίο κόλπο. Παρατηρήθηκε επίσης πάχυνση του τοιχώματος των δύο θηλών (Εικόνα IV.9.β).

Δεν παρατηρήθηκαν άλλα παθολογικά ευρήματα.

Βακτηριολογικά ευρήματα

Από τα δείγματα δεν απομονώθηκαν βακτήρια.

Ιστοπαθολογικά ευρήματα

Αριστερή θηλή και σύστοιχος μαστικός αδένας

Παρατηρήθηκαν έντονη διήθηση από λεμφοκύτταρα και καταστροφή αδενοκυψελίδων στο μαστικό παρέγχυμα (Εικόνα IV.9.γ).

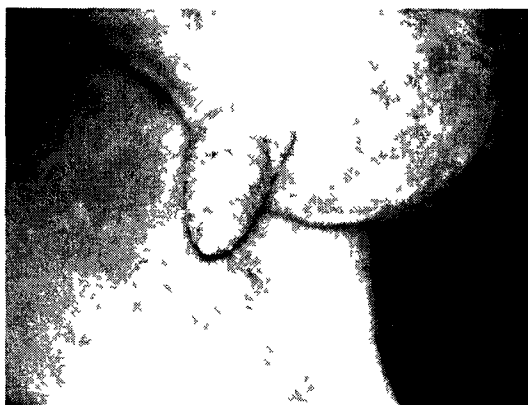
Δεξιά θηλή και δεξιός μαστικός αδένας

Παρατηρήθηκε απώλεια της δομής του μαστικού παρεγχύματος (Εικόνα IV.9.δ).

Διάγνωση

Πιθανή χρόνια φλεγμονή των θηλών με συνακόλουθη στένωση.

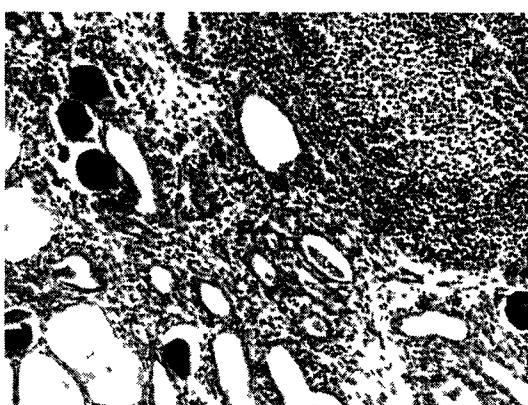
Εικόνα IV.9. Ευρήματα στο κλινικό περιστατικό Αρ. 9.



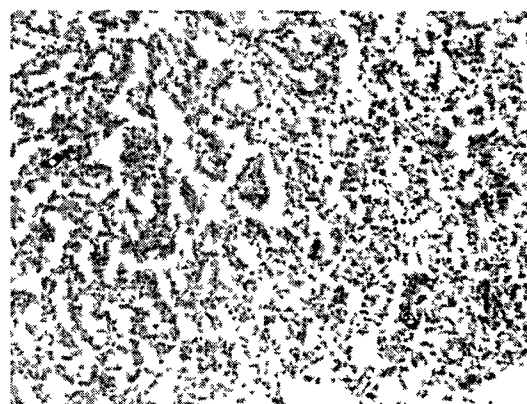
α. Πάχυνση του τοιχώματος της θηλής.



β Πάχυνση του βλεννογόνου και του τοιχώματος της θηλής



γ. Διήθηση από λεμφοκύτταρα και καταστροφή αδενοκυψελίδων στο αριστερό μαστικό παρέγχυμα (X100, χρώση Η&Ε).



δ Απώλεια δομής στο δεξιό μαστικό παρέγχυμα (X200, χρώση Η&Ε)

Κλινικό περιστατικό Αρ. 10

Ιστορικό - Κλινικά ευρήματα

Το κλινικό περιστατικό αφορούσε σε προβατίνα ηλικίας 3 ετών, στην περίοδο θηλασμού η οποία εξετάστηκε σε εκτροφή της περιοχής της Καρδίτσας. Ο κτηνοτρόφος ανέφερε ότι υπήρχε δυσκολία στην έξοδο του γάλακτος.

Κατά την κλινική εξέταση παρατηρήθηκαν εφελκίδες και εξελκώσεις με διάμετρο 0,5 έως 0,7 mm, σε 3 ή 4 σημεία στο δέρμα κοντά στο στόμιο κάθε θηλής. Η έξοδος του μαστικού εκκρίματος από τις δύο θηλές, γινόταν με μεγάλη δυσκολία. Το έκκριμα του αριστερού μαστικού αδένου ήταν ορώδες. Στους μαστικούς αδένες παρατηρήθηκε αυξημένη θερμοκρασία και μέγεθος (Εικόνα IV.10.α). Επιπλέον παρατηρήθηκαν εφελκίδες στα χείλη του αμνού της προβατίνας (Εικόνα IV.10.β).

Κυτταρολογικά ευρήματα

Η δοκιμή CMT ήταν θετική στα δείγματα και από τους δύο μαστικούς αδένες ("3"). Στη επιχρίσματα και τους δύο μαστικούς αδένες βρέθηκαν κυρίως ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα (90%) και λεμφοκύτταρα (10%).

Βακτηριολογικά ευρήματα

Από το δείγμα υλικού από τον αριστερό θηλαίο πόρο και από το δείγμα εκκρίματος από τον αριστερό μαστικό αδένά απομονώθηκε *M. haemolytica*. Από το δείγμα υλικού από το δεξιό θηλαίο πόρο και από το δείγμα εκκρίματος από το δεξιό μαστικό αδένά απομονώθηκε *M. haemolytica*.

Ιολογικά ευρήματα

Στα δείγματα των εφελκίδων ανιχνεύτηκε νουκλεϊνικό οξύ του ιού του λοιμώδους εκθύματος.

Διάγνωση

Λοιμώδες έκθυμα.

Εικόνα IV.10. Ευρήματα στο κλινικό περιστατικό Αρ. 10.



α. Εφελκίδες στο στόμιο των θηλών της προβατίνας.

Εικόνα IV.10. Ευρήματα στο κλινικό περιστατικό Αρ. 10 (συνέχεια).



β. Εφελκίδες στα χείλη του αρνιού.

Ανακεφαλαίωση

Τα ευρήματα των κλινικών περιστατικών παρουσιάζονται περιληπτικά στον Πίνακα IV.i.

Πίνακας IV.i. Περιληπτική παρουσίαση των κυριότερων ευρημάτων των κλινικών περιστατικών.

Αρ. περιστατικού	Κλινικά ευρήματα	Κυτταρολογικά ευρήματα	Μακροσκοπικά νεκροτομικά ευρήματα	Βακτηριολογικά ευρήματα	Ιστοπαθολογικά ευρήματα	Διάγνωση
1	L	Μεγάλο μέγεθος θηλής	CMT = "2", ουδ. λευκ.	(ΔΠ)	υπ, με: S. <i>epidermidis</i>	Υπερμεγέθης θηλή
	R	Μεγάλο μέγεθος θηλής	CMT = "2", ουδ. λευκ.	(ΔΠ)	υπ, με: S. <i>epidermidis</i>	Υπερμεγέθης θηλή
2	L	Δύο οζίδια στη θηλή	CMT = "2", ουδ. λευκ.	Οζίδια συμπαγή χωρίς υλικό	υπ, με, μπ: S. <i>simulans</i>	Πιθανή θηλωμάτωση - υποδόριο οζίδιο
	R	Ένα οζίδιο στη θηλή	CMT = "2", ουδ. λευκ.	Οζίδιο συμπαγές, υπεραμικό	-	Υποδόριο οζίδιο
3	L		CMT = "1"	Οζίδιο συμπαγές χωρίς υλικό	θα, μπ: λευκ/ική διήθηση	
	R	Δερματίτιδα και υπερκεράτωση στο δέρμα του μαστού, με φλύκταινες	CMT = "3"	-	Δέρμα μαστού και θηλών: S. <i>aureus</i>	θα, μπ: λευκ/ική διήθηση λεμφοκυττάρων - μπ: λευκ/ική διήθηση, καταστροφή αδεν/ιδίων
4	L	Οζίδιο στη θηλή	CMT = "1", ουδ. λευκ.	Οζίδιο συμπαγές	μπ: λευκ/ική διήθηση	Υποδόριο οζίδιο στη θηλή
	R	Οζίδιο στη θηλή	CMT = "1", ουδ. λευκ.	Οζίδιο με πυώδες υλικό	ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ οζιδίου: S. <i>aureus</i>	Υποδόριο οζίδιο στη θηλή

Πίνακας IV.i. Περιληπτική παρουσίαση των κυριότερων ευρημάτων των κλινικών περιστατικών (συνέχεια).

Αρ. περιστατικού	Κλινικά ευρήματα	Κυτταρολογικά ευρήματα	Μακροσκοπικά νεκροτομικά ευρήματα	Βακτηριολογικά ευρήματα	Ιστοπαθολογικά ευρήματα	Διάγνωση
L	-	CMT = "αρνητικό"	-	-	-	-
5	Απόστημα στη θηλή	CMT = "2", ουδ.τ. λευκ.	Υποδόριο απόστημα στη θηλή	υθπ. με, μπ: <i>M. haemolytica</i> περιεχόμενο αποστήματος: <i>M. haemolytica</i>	θλ, μπ: λευκ/ική διήθηση - μπ: καταστροφή αδεν/ιδων	Υπόδριο απόστημα στη θηλή
L	Τραυματισμοί στη θηλή	CMT = "1", ουδ.τ. λευκ.	(ΔΠ)	-	(ΔΠ)	Τραυματισμοί της θηλής
R	Τραυματισμοί στη θηλή	CMT = "2", ουδ.τ. λευκ.	(ΔΠ)	υθπ: <i>M. haemolytica</i>	(ΔΠ)	Τραυματισμοί της θηλής
L	Τραυματισμοί στη θηλή	CMT = "2", ουδ.τ. λευκ.	(ΔΠ)	υθπ: <i>M. haemolytica</i>	(ΔΠ)	Τραυματισμοί της θηλής
R	-	CMT = "2", ουδ.τ. λευκ.	(ΔΠ)	-	(ΔΠ)	-
L	Μισχωτές εκβλαστήσεις στη θηλή	CMT = "αρνητικό"	Μορφώματα συμπαγή χωρίς υλικό	θλ, μπ: λευκ/ική διήθηση, καταστροφή αδεν/ιδων	θλ, μπ: λευκ/ική διήθηση, καταστροφή αδεν/ιδων	Πιθανή θηλωμάτωση
R	Μισχωτές εκβλαστήσεις στη θηλή	CMT = "αρνητικό"	Μορφώματα συμπαγή χωρίς υλικό	υθπ: <i>S. epidermidis</i>	θλ, μπ: λευκ/ική διήθηση, καταστροφή αδεν/ιδων	Πιθανή θηλωμάτωση
L	Πάχυνση της θηλής	CMT = "αρνητικό"	Πάχυνση του βλεννογόνου της θηλής	-	μπ: λευκ/ική διήθηση, καταστροφή αδεν/ιδων	Πιθανή χρόνια θηλίτιδα + στένωση
R	Πάχυνση της θηλής	CMT = "αρνητικό"	Πάχυνση του βλεννογόνου της θηλής	-	μπ: απώλεια δομής	Πιθανή χρόνια θηλίτιδα + στένωση

Πίνακας IV.i. Περιληπτική παρουσίαση των κυριότερων ευρημάτων των κλινικών περιστατικών (συνέχεια).

Αρ. περιστατικού	Κλινικά ευρήματα	Κυτταρολογικά ευρήματα	Μακροσκοπικά νεκροτομικά ευρήματα	Βακτηριολογικά ευρήματα	Ιστοπαθολογικά ευρήματα	Διάγνωση
10	Εφελκίδες και εξελκώσεις κλινική μαστίπδα	CMT = "3", ουδ.τ. λευκ.	(ΔΠ)	υθπ, με: <i>M. haemolytica</i>	(ΔΠ)	Λοιμώδες έκθυμα
	Εφελκίδες και εξελκώσεις	CMT = "3", ουδ.τ. λευκ.	(ΔΠ)	υθπ, με: <i>M. haemolytica</i>	(ΔΠ)	Λοιμώδες έκθυμα

L / R: αριστερός / δεξιός μαστικός αδένας, CMT: California Mastitis Test, ουδ.τ. λευκ.: ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα, (ΔΠ): δεν πραγματοποιήθηκε, υθπ: υλικό από το θηλαίο πόρο, με: μαστικό έκκριμα, μπ: μαστικό παρέγχυμα, θλ: θηλή, λευκ/ική: λευκοκυτταρική, αδεν/ίδων: αδενοκυψελίδων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ V

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΟΣ *MANNHEIMIA HAEMOLYTICA* ΣΕ ΘΗΛΕΣ ΠΡΟΒΑΤΩΝ ΜΕ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στο Κεφάλαιο II και στο Κεφάλαιο III παρουσιάστηκαν κλινικά και πειραματικά ευρήματα σχετικά με το ρόλο της υγιούς θηλής των προβάτων. Στο Κεφάλαιο IV παρουσιάστηκαν κλινικά περιστατικά παθήσεων των θηλών σε προβατίνες. Τα περιστατικά αυτά παρέχουν μία πρώτη ένδειξη σχετικά με τη φύση των παθήσεων των θηλών στις προβατίνες.

Στους δύο πειραματισμούς που παρουσιάζονται στο Κεφάλαιο αυτό διερευνήθηκαν τα αποτελέσματα του ενοφθαλμισμού *Mannheimia haemolytica* σε θηλές προβάτων με αλλοιώσεις. Επιπλέον, περιγράφηκαν τα κλινικά, μικροβιολογικά, κυτταρολογικά και παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά της μόλυνσης. Τα ευρήματα συγκρίθηκαν με αυτά του πειραματισμού που περιγράφεται προηγουμένως (Κεφάλαιο III, Τμήμα Β), ώστε να μελετηθούν οι διαφορές στην ανταπόκριση μεταξύ θηλών κλινικά υγιών και θηλών με αλλοιώσεις.

B. ΣΥΝΕΠΕΙΕΣ ΤΟΥ ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΟΥ

Υλικά και μέθοδοι

Πειραματικός σχεδιασμός, πειραματόζωα και βακτηριακό στέλεχος

Οι πειραματισμοί πραγματοποιήθηκαν με βάση σχετική άδεια από τη Διεύθυνση Κτηνιατρικής της Νομαρχιακής Αυτοδιοίκησης Καρδίτσας. Σε αυτούς χρησιμοποιήθηκαν 26 προβατίνες Καραγκούνικης φυλής, κατά τη διάρκεια της γαλακτοπαραγωγικής περιόδου τους. Τα ζώα προέρχονταν από εκτροφή της περιοχής Καρδίτσας. Κατά τη διάρκεια του πειραματισμού, τα ζώα σταβλίστηκαν στις εγκαταστάσεις της Κλινικής, τους χορηγούνταν δε δύο φορές την ημέρα 750 g έτοιμης συμπυκνωμένης ζωοτροφής σε αλευρώδη μορφή (Ζωοτεχνική Καρδίτσας, Καρδίτσα), καθώς επίσης και άριστης ποιότητας σανός κατά βούληση.

Πριν την έναρξη του πειραματισμού, σε κάθε ζώο πραγματοποιήθηκε αποπαρασιτισμός με υποδόρια χορήγηση μοξιδεκτίνης 1% ενέσιμο διάλυμα (Cydectin®) 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 του πειραματισμού.

1ος πειραματισμός: ενοφθαλμισμός M. haemolytica στο θηλαίο πόρο προβάτων με λοιμώδες έκθυμα ή θηλωμάτωση

Στον πειραματισμό χρησιμοποιήθηκαν οκτώ προβατίνες, ηλικίας 3 έως 5 ετών. Τα ζώα που επιλέχθηκαν είχαν αλλοιώσεις και στις δύο θηλές τους, με βάση δε την κλινική διάγνωση θεωρήθηκε ότι τα ζώα της ομάδας A (n=5) είχαν αλλοιώσεις λοιμώδους εκθύματος, της δε ομάδας B (n=3) αλλοιώσεις θηλωμάτωσης. Η κλινική διάγνωση επιβεβαιώθηκε από τα αποτελέσματα της ιολογικής εξέτασης, η οποία πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο IV, Τμήμα Β). Οι αλλοιώσεις στις θηλές ανιχνεύτηκαν 15 έως 20 ημέρες μετά τον τοκετό.

Αμέσως μετά την ολοκλήρωση της εργαστηριακής διάγνωσης οι αμνοί των προβάτων απογαλακτίστηκαν (20η έως 25η ημέρα μετά τον τοκετό) και στη συνέχεια τα πειραματόζωα αρμέγονταν, πάντοτε από το ίδιο άτομο, τρεις φορές καθημερινά. Δύο ημέρες μετά τον απογαλακτισμό των αμνών (22η έως 27η ημέρα μετά τον τοκετό) πραγματοποιήθηκε ο ενοφθαλμισμός των ζώων (ημέρα D0). Σε όλα τα ζώα ενοφθαλμίστηκαν 1250 βακτηριακά κύτταρα (c.f.u.) *M. haemolytica* (στέλεχος VSM08L, λεπτομέρειες στο Κεφάλαιο III, Τμήμα Β) σε απόσταση 2 mm από το στόμιο της θηλής τους.

2ος πειραματισμός: ενοφθαλμισμός *M. haemolytica* στο θηλαίο πόρο ή στο δέρμα των θηλών προβάτων, με τεχνητά προκληθείσες αλλοιώσεις στις θηλές

Στον πειραματισμό χρησιμοποιήθηκαν 11 πρωτότοκες προβατίνες. Οι αμνοί των προβάτων απογαλακτίστηκαν τη 18η ημέρα μετά τον τοκετό και στη συνέχεια τα πειραματόζωα αρμέγονταν, πάντοτε από το ίδιο άτομο, τρεις φορές καθημερινά. Τέσσερις μέρες μετά τον απογαλακτισμό (22η ημέρα της γαλακτικής περιόδου) άρχισε η διαδικασία πρόκλησης αλλοιώσεων στις θηλές, όπως περιγράφεται παρακάτω.

Οι προβατίνες συγκρατήθηκαν σε όρθια θέση και οι μαστικοί αδένες κενώθηκαν με άρμεξη. Μετά από 30 min., το κατώτερο άκρο κάθε θηλής (3,0 έως 3,5 cm) εμβάπτιστηκε επί 60 sec. σε πλαστικό δοχείο, το οποίο περιείχε 50 ml διαλύματος καυστικού νατρίου, κανονικότητας 1 N, προκαλώντας αλλοιώσεις τύπου "charring" (σκασίματα). Η διαδικασία επαναλήφθηκε την επόμενη ημέρα (ημέρα D-3 και ημέρα D-2). Το αποτέλεσμα των αλλοιώσεων που προκλήθηκαν βαθμολογήθηκε σύμφωνα με την κλίμακα κατάταξης αλλοιώσεων θηλών, που έχει περιγραφεί από τους Fox, Nagy, Hillers, Cronrath και Ratkowsky (1991) (Πίνακας V.i). Αλλοιώσεις προκλήθηκαν και στις δύο θηλές.

Στη συνέχεια, τα ζώα χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, ομάδα Γ (n=7) και ομάδα Δ (n=4). Στη συνέχεια, στα ζώα της ομάδας Γ ενοφθαλμίστηκαν 1250 c.f.u. *M. haemolytica* (στέλεχος VSM08L) σε απόσταση 2 mm από το στόμιο της θηλής τους. Οι θηλές των ζώων της ομάδας Δ εμβάπτιστηκαν σε ζωμό με 2×10^8 c.f.u. *M. haemolytica* (στέλεχος VSM08L).

Πίνακας V.i. Κλίμακα κατάταξης των αλλοιώσεων στις θηλές μετά από εμβάπτιση σε διάλυμα καυστικού νατρίου (Fox και συν. 1991).

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

Μάρτυρες

Ως μάρτυρες των δύο πειραματισμών χρησιμοποιήθηκαν επτά πρωτότοκες προβατίνες Καραγκούνικης φυλής. Οι αμνοί των προβάτων απογαλακτίστηκαν τη 18η ημέρα μετά τον τοκετό και στη συνέχεια τα πειραματόζωα αρμέγονταν, πάντοτε από το ίδιο άτομο, τρεις φορές καθημερινά. Τα ζώα χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, ομάδα Ε (n=5) και ομάδα ΣΤ (n=2). Στη συνέχεια, στα ζώα της ομάδας Ε ενοφθαλμίστηκαν 1250 c.f.u. *M. haemolytica* (στέλεχος

VSM08L) σε απόσταση 2 mm από το στόμιο της θηλής τους. Οι θηλές των ζώων της ομάδας ΣΤ εμβαπτίστηκαν τέσσερις φορές σε ζωμό με 2×10^8 c.f.u. *M. haemolytica* (στέλεχος VSM08L).

Ο όλος πειραματικός σχεδιασμός παρουσιάζεται συνοπτικά στον πίνακα V.ii.

Πίνακας V.ii. Περιληπτική παρουσίαση του πειραματικού σχεδιασμού.

Ομάδα - Αλλοιώσεις στις θηλές	Μέθοδος και σημείο ενοφθαλμισμού	Χρονικά σημεία ευθανασίας των ζώων μετά τον ενοφθαλμισμό
A (n=5) - Αλλοιώσεις λοιμώδους εκθύματος	1250 c.f.u. σε απόσταση 2 mm από το στόμιο της θηλής	2 h, 5 h, 12 h, 1 d, 3 d
B (n=3) - Αλλοιώσεις θηλωμάτωσης	1250 c.f.u. σε απόσταση 2 mm από το στόμιο της θηλής	5 h, 1 d, 3 d
Γ (n=7) - Αλλοιώσεις τύπου "chapping"	1250 c.f.u. σε απόσταση 2 mm από το στόμιο της θηλής	2 h, 5 h, 12 h, 1 d, 2 d, 3 d, 4 d
Δ (n=4) - Αλλοιώσεις τύπου "chapping"	Εμβάπτιση της θηλής σε ζωμό με 2×10^8 c.f.u.	1 d, 2 d, 3 d, 4 d
Ε (n=5) - Μάρτυρες	1250 c.f.u. σε απόσταση 2 mm από το στόμιο της θηλής	12 h, 1 d, 2 d, 3 d, 4 d
ΣΤ (n=2) - Μάρτυρες	Εμβάπτιση της θηλής σε ζωμό με 2×10^8 c.f.u.	2 d, 4 d

Για τον ενοφθαλμισμό των ζώων, χρησιμοποιήθηκε *M. haemolytica* στέλεχος VSM08L.

Προετοιμασία του ενοφθαλμίσματος και τεχνική ενοφθαλμισμού

Η προετοιμασία του ενοφθαλμίσματος έγινε όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο III, Τμήμα Β). Στη συνέχεια, όσον αφορά στα ζώα των ομάδων Α, Β, Γ και Ε, χρησιμοποιήθηκε 0,2 ml της απαιτούμενης διάλυσης του στελέχους, που αναρροφήθηκε με μία σύριγγα ινσουλίνης. Για τις προβατίνες της ομάδας Δ και ΣΤ χρησιμοποιήθηκε όλη η ποσότητα του ζωμού της καλλιέργειας του βακτηρίου. Ο αριθμός των μικροοργανισμών στο ενοφθάμισμα προσδιορίστηκε με βάση τη μέθοδο των Miles και Misra (1938).

Ο ενοφθαλμισμός πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την ίδια τεχνική που περιγράφηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο III, Τμήμα Β). Συγκεκριμένα, στα ζώα των ομάδων Α, Β, Γ και Ε το ενοφθάμισμα τοποθετήθηκε στη θηλή σε απόσταση 2 mm από το στόμιο της θηλής (όπως σε αυτά των υποομάδων Α3/Β3) (ημέρα D0). Στα ζώα των ομάδων Δ και ΣΤ πραγματοποιήθηκαν τέσσερις εμβαπτίσεις της θηλής σε ζωμό καλλιέργειας του μικροοργανισμού (όπως σε αυτά των υποομάδων Α2/Β2), δηλαδή δύο εμβαπτίσεις καθημερινά (ημέρα D-1 και ημέρα D0). Ο αριθμός των μικροοργανισμών στο ενοφθάμισμα προσδιορίστηκε με βάση τη μέθοδο των Miles και Misra (1938).

Η ίδια ακριβώς τεχνική εφαρμόστηκε για την έγχυση 0,2 ml στείρου PBS, στο αντίστοιχο σημείο της άλλης θηλής (Α, Β, Γ, Ε) ή για την εμβάπτιση της άλλης θηλής κάθε προβατίνας σε δοχείο με 40 ml στείρο PBS (Δ, ΣΤ) ακολουθώντας την ίδια διαδικασία.

Κλινικές και εργαστηριακές εξετάσεις πριν και μετά τον ενοφθαλμισμό

Κλινική εξέταση

Στα ζώα του 1ου πειραματισμού, η γενική κλινική εξέταση των ζώων και η κλινική εξέταση του μαστικού αδένος και των θηλών τους άρχισε αμέσως μετά τη διάγνωση της πάθησης και πραγματοποιούνταν καθημερινά έως και την ημέρα του ενοφθαλμισμού (ημέρα D0). Μετά τον ενοφθαλμισμό η κλινική εξέταση των ζώων πραγματοποιήθηκε καθημερινά 2 ώρες, 5 ώρες, 12 ώρες, 18 ώρες, 24 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό και στη συνέχεια καθημερινά (εκτός βέβαια εάν είχε ήδη γίνει ευθανασία στο πειραματόζωο).

Στα ζώα του 2ου πειραματισμού και τους μάρτυρες, η γενική κλινική εξέταση και η κλινική εξέταση του μαστικού αδένος και των θηλών άρχισε αμέσως μετά τον τοκετό και πραγματοποιούνταν κάθε δεύτερη ημέρα, έως και την ημέρα του ενοφθαλμισμού (25η ημέρα μετά τον τοκετό, D0). Μετά τον ενοφθαλμισμό η κλινική εξέταση των ζώων πραγματοποιήθηκε 2 ώρες, 5 ώρες, 12 ώρες, 18 ώρες, 24 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό και στη συνέχεια καθημερινά (εκτός βέβαια εάν είχε ήδη γίνει ευθανασία στο πειραματόζωο).

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

Δειγματοληψίες

Στα ζώα του 1ου πειραματισμού δειγματοληψία υλικού από το θηλαίο πόρο και μαστικού εκκρίματος πραγματοποιούνταν καθημερινά πριν τον ενοφθαλμισμό τους. Επιπλέον, γινόταν δειγματοληψία από το δέρμα και το κατώτερο άκρο της θηλής χρησιμοποιώντας αποστειρωμένο βαμβακοφόρο σπειρό, που είχε εμποτιστεί σε στείρο ζωμό Soy (BioMerieux SA, Marcy-l'Etoile, Γαλλία). Στη συνέχεια, δειγματοληψία μαστικού εκκρίματος πραγματοποιούνταν 12 ώρες, 18 ώρες, 24 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό, και στη συνέχεια καθημερινά (εκτός βέβαια εάν είχε ήδη γίνει ευθανασία στο πειραματόζωο). Ειδικά στα ζώα, στα οποία έγινε ευθανασία 2 ώρες και 5 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό, ελήφθησαν δείγματα στο συγκεκριμένο χρονικό σημείο.

Στα ζώα του 2ου πειραματισμού και στους μάρτυρες δειγματοληψία υλικού από το θηλαίο πόρο και μαστικού εκκρίματος πραγματοποιούνταν κάθε δεύτερη ημέρα, από τη δεύτερη ημέρα μετά τον τοκετό έως και την ημέρα του ενοφθαλμισμού. Επιπλέον, γινόταν δειγματοληψία από το δέρμα και το κατώτερο άκρο της θηλής χρησιμοποιώντας αποστειρωμένο βαμβακοφόρο σπειρό, που είχε εμποτιστεί σε στείρο ζωμό Soy (BioMerieux SA, Marcy-l'Etoile Γαλλία). Μετά τον ενοφθαλμισμό, δειγματοληψία μαστικού εκκρίματος πραγματοποιείτο 2 ώρες, 18 ώρες, 24 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό, και στη συνέχεια καθημερινά (εκτός βεβαίως εάν είχε ήδη γίνει ευθανασία στο πειραματόζωο). Ειδικά στα ζώα, στα οποία έγινε ευθανασία 2 ώρες και 5 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό, ελήφθησαν δείγματα στο συγκεκριμένο χρονικό σημείο.

Μετά τον ενοφθαλμισμό δειγματοληψία υλικού από το θηλαίο πόρο και δειγματοληψία από το δέρμα και το κατώτερο άκρο της θηλής γινόταν μόνο στα ζώα των ομάδων Δ και ΣΤ, στα ίδια όπως παραπάνω χρονικά σημεία.

Οι δειγματοληψίες έγιναν, όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο III, Τμήμα Β).

Κυτταρολογική εξέταση

Σε κάθε δείγμα μαστικού εκκρίματος πραγματοποιήθηκε η δοκιμή CMT, όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο I, 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 μαστικό έκκριμα για χρώση Giemsa.

Παθολογοανατομική εξέταση

Η ευθανασία των πειραματόζωων πραγματοποιήθηκε υπό γενική αναισθησία στα χρονικά σημεία μετά τον ενοφθαλμισμό τους, που περιγράφονται στον Πίνακα V.ii. Σε κάθε ζώο πραγματοποιήθηκε νεκροτομή και, εφαρμόζοντας συνθήκες άσηπτης δειγματοληψίας, ελήφθησαν δείγματα ιστών από το ήπαρ και τον σπλήνα του για βακτηριολογική εξέταση.

Στη συνέχεια, αφαιρέθηκε ο μαστός και έγινε λεπτομερής εξέταση του. Αρχικά, οι μαστικοί αδένες και οι θηλές εξετάστηκαν με επισκόπηση και ψηλαφήθηκαν σε όλη την έκτασή τους. Στη συνέχεια έγινε θηλεκτομή στη βάση κάθε θηλής. Η εξέταση των μαστικών αδένων και των θηλών έγινε όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο III, Τμήμα Β).

Κατά τη διάρκεια της εξέτασης λαμβάνονταν υπό άσηπτες συνθήκες, όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο III, Τμήμα Β), δείγματα ιστού από το μαστικό παρέγχυμα και τα επιχώρια λεμφογάγγλια, καθώς και ξέσματα από το βλεννογόνο του θηλαίου πόρου και του θηλαίου κόλπου για βακτηριολογική εξέταση.

Τέλος, από κάθε μαστικό αδένα ελήφθησαν δείγματα παρεγχύματος και όλη η θηλή για ιστολογική εξέταση. Τα δείγματα συντηρήθηκαν και επεξεργάστηκαν όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο III, Τμήμα Β).

Βακτηριολογική εξέταση

Όλα τα δείγματα που συλλέχθηκαν: υλικό από το θηλαίο πόρο, δείγματα μαστικού εκκρίματος, βύσματα από τη δειγματοληψία του δέρματος, ξέσματα (στη χειρουργική λεπίδα) από το θηλαίο πόρο, ξέσματα (στη χειρουργική λεπίδα) από το θηλαίο κόλπο και δείγματα ιστών, καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία με αιματούχο (5% πρόβειο αίμα) άγαρ Columbia (BioMerieux SA, Marcy-l'-Etoile, Γαλλία), τα οποία επωάστηκαν σε αερόβιο περιβάλλον σε θερμοκρασία 37 °C έως 72 ώρες. Η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών που αναπτύχθηκαν έγινε με τη χρήση

καθιερωμένων βακτηριολογικών εξετάσεων (Barrow & Feltham 1993) και τις ταχείες δοκιμές API (BioMerieux, Marcy-l'-Etoile, Γαλλία).

Υπολογισμοί και στατιστική ανάλυση

Τα ποσοστά των ενοφθαλισμένων θηλών στο σύστοιχο μαστικό αδέννα, των οποίων εκδηλώθηκε κλινική μαστίτιδα, στις διάφορες ομάδες συγκρίθηκαν μεταξύ τους με βάση τη δοκιμή "Fisher-Exact Test". Αρχικά, η εκδήλωση μαστίτιδας στο σύστοιχο προς την ενοφθαλισμένη θηλή αδέννα συγκρίθηκε με αυτήν στον άλλο αδέννα του ίδιου ζώου. Στη συνέχεια, τα αποτελέσματα στις προβατίνες σε καθέναν από τους δύο πειραματισμούς συγκρίθηκαν με αυτά στους μάρτυρες. Τέλος, η ίδια δοκιμή χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να συγκριθούν τα αποτελέσματα στις προβατίνες στους παρόντες δύο πειραματισμούς, με εκείνα στα ζώα με κλινικά υγιείς θηλές (Κεφάλαιο III, Τμήμα Β), δεδομένου ότι σε εκείνα τα ζώα εφαρμόστηκαν ακριβώς όμοιες πειραματικές μέθοδοι, όπως στους μάρτυρες των παρόντων δύο πειραματισμών.

Διαστήματα εμπιστοσύνης 97,5% για την πιθανότητα κάποια προβατίνα με αλλοιώσεις στις θηλές να εκδηλώσει κλινική μαστίτιδα υπολογίστηκαν χωριστά, για τα ζώα του 1ου πειραματισμού και του 2ου πειραματισμού. Ζώα, στα οποία έγινε ευθανασία πριν παρέλθουν 12 ώρες από τον ενοφθαλισμό τους, δεν ελήφθησαν υπόψη σε αυτήν την ανάλυση.

Σε κάθε θηλή που ενοφθαλμίστηκε υπολογίστηκε το άθροισμα του αριθμού των σημείων δειγματοληψίας στη θηλή και το μαστικό αδέννα, από τα οποία απομονώθηκαν βακτήρια κατά την παθολογοανατομική εξέταση (δηλαδή: θηλαίος πόρος, θηλαίος κόλπος, μαστικό παρέγχυμα). Συνεπώς, το άθροισμα κυμαινόταν από "0" (απουσία απομόνωσης βακτηρίων από οποιοδήποτε σημείο) έως "3" (απομόνωση βακτηρίων και από τα τρία σημεία). Στη συνέχεια, η διάμεσος τιμή για τις ομάδες Α, Β, Γ και Δ και αυτή για τους μάρτυρες (ομάδες Ε και ΣΤ) υπολογίστηκαν σε κάθε χρονικό σημείο ευθανασίας και παρουσιάστηκαν ως γραφική παράσταση.

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

Αποτελέσματα

Κλινικά, βακτηριολογικά και κυτταρολογικά ευρήματα πριν τον ενοφθαλμισμό

Στον 1ο πειραματισμό παρατηρήθηκαν χαρακτηριστικά κλινικά ευρήματα λοιμώδους εκθύματος στις θηλές των πειραματόζωνων της ομάδας Α. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν, σε δύο ή τρία σημεία, εφελκίδες διαμέτρου 1 mm κοντά στο στόμιο κάθε θηλής. Στα ζώα της ομάδας Β παρατηρήθηκαν τρεις έως πέντε μη μισχωτές οζώδεις εκβλαστήσεις, με διάμετρο 0,5 έως 1 cm, εντοπιζόμενες στο μέσον και το κατώτερο τμήμα της θηλής χαρακτηριστικής θηλωμάτωσης. Αλλοιώσεις υπήρχαν και στις δύο θηλές κάθε πειραματόζου. Εκτός από αυτές τις αλλοιώσεις δεν υπήρχαν άλλα παθολογικά ευρήματα στο μαστικό παρέγχυμα ή τις θηλές των προβάτων.

Στο 2ο πειραματισμό όλες οι προβατίνες ήταν κλινικά υγιείς από τον τοκετό μέχρι την εμφάνιση στο διάλυμα NaOH. Οι θηλές τους ήταν μαλακές, χωρίς εξωτερικές ή εσωτερικά ψηλαφητές αλλοιώσεις. Μετά την εμφάνιση στο διάλυμα NaOH όλες οι θηλές εκδήλωσαν αλλοιώσεις με βαρύτητα "2" έως "3" στην κλίμακα των Fox και συν. (1991).

Όλες οι προβατίνες, που συμμετείχαν ως μάρτυρες, ήταν κλινικά υγιείς από τον τοκετό μέχρι τον ενοφθαλμισμό τους. Οι θηλές τους ήταν μαλακές, χωρίς εξωτερικές ή εσωτερικά ψηλαφητές αλλοιώσεις.

Από τα δείγματα από το δέρμα της θηλής απομονώθηκε μία ποικιλία βακτηρίων, η πλειονότητα των οποίων ήταν πηκτάση-αρνητικοί Σταφυλόκοκκοι. Σε ορισμένες περιπτώσεις απομονώθηκαν και άλλα βακτήρια, όπως *Bacillus* spp. ή *Acinetobacter* spp.. Από τη 10η ημέρα μετά τον τοκετό σποραδικά απομονώθηκε και *M. haemolytica* (από 2 προβατίνες ομάδας Γ, από 2 προβατίνες ομάδας Ε και από 1 προβατίνα ομάδας ΣΤ).

Από το υλικό από το θηλαίο πόρο και από το μαστικό έκκριμα δεν απομονώθηκαν βακτήρια.

Στον 1ο πειραματισμό η δοκιμή CMT ήταν αρνητική σε όλα τα δείγματα, στα δε επιχρίσματα μαστικού εκκρίματος δεν παρατηρήθηκαν λευκοκύτταρα. Στο 2ο πειραματισμό και μέχρι την εμφάνιση στο διάλυμα NaOH η δοκιμή CMT ήταν αρνητική σε όλα τα δείγματα, στα δε επιχρίσματα μαστικού εκκρίματος δεν παρατηρήθηκαν λευκοκύτταρα. Στη συνέχεια, η δοκιμή CMT ήταν θετική ("1"), στα δε επιχρίσματα μαστικού εκκρίματος παρατηρήθηκαν λευκοκύτταρα (80-90% ουδετερόφιλα, 10-20% μακροφάγα). Στους μάρτυρες η δοκιμή CMT ήταν αρνητική σε όλα τα δείγματα, στα δε επιχρίσματα μαστικού εκκρίματος δεν παρατηρήθηκαν λευκοκύτταρα.

Κλινικά, βακτηριολογικά και κυτταρολογικά ευρήματα μετά τον ενοφθαλμισμό

1ος πειραματισμός

Ομάδα Α: ενοφθαλμισμένες θηλές και σύστοιχοι μαστικοί αδένες

Οι προβατίνες της ομάδας Α, εκτός από αυτήν στην οποία έγινε ευθανασία 2 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό, εκδήλωσαν κλινική μαστίτιδα (4/5). Μία εκδήλωσε κλινική μαστίτιδα 5 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό (έγινε ευθανασία) και οι υπόλοιπες τρεις 12 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό. Συγκεκριμένα, εκδήλωσαν πυρετό (έως 41,3 °C), ανορεξία, κατάπτωση, χλωρότητα στο σύστοιχο οπίσθιο άκρο και ατονία της μεγάλης κοιλίας. Τα κλινικά συμπτώματα διατηρήθηκαν μέχρι την ευθανασία των ζώων.

Τα κλινικά ευρήματα στους μαστικούς αδένες ήταν έντονα, χαρακτηριστικά της κλινικής μαστίτιδας από *M. haemolytica* και παρόμοια με αυτά που αναφέρθηκαν προηγουμένως (Κεφάλαιο III, Τμήμα Β) σε ζώα που είχαν ενοφθαλμιστεί στο μαστικό παρέγχυμα (Εικόνα V.1.α.). Το μαστικό έκκριμα ήταν ορώδες και περιείχε πύγματα (3/5) ή ήταν αιμορραγικό (1/5). Στις θηλές παρατηρήθηκαν μόνον οι αλλοιώσεις του λοιμώδους εκθύματος (Εικόνα V.1.α.).

Σε όλη τη διάρκεια του πειραματισμού, από το μαστικό έκκριμα όλων των ζώων (5/5) απομονώθηκε *M. haemolytica* σε καθαρή καλλιέργεια.

Η δοκιμή CMT ήταν θετική (>"1") σε όλα τα δείγματα μαστικού εκκρίματος από 4/5 ζώα, από 5 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό έως την ευθανασία τους.

Στα επιχρίσματα μαστικού εκκρίματος παρατηρήθηκαν τα παρακάτω. Σε αυτά από το ζώο στο οποίο έγινε ευθανασία 2 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό, δε βρέθηκαν λευκοκύτταρα. Σε αυτά από το ζώο στο οποίο έγινε ευθανασία 5 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό, βρέθηκαν ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα (100%). Σε αυτά από το ζώο στο οποίο έγινε ευθανασία 12 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό, βρέθηκαν λεμφοκύτταρα (100%). Σε αυτά από το ζώο στο οποίο έγινε ευθανασία την D1, αρχικά (δείγμα 12 ωρών) βρέθηκαν λεμφοκύτταρα (77%) και ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα (23%) και στη συνέχεια (D1) δε βρέθηκαν λευκοκύτταρα. Τέλος, σε αυτά από το ζώο στο οποίο έγινε ευθανασία την D3, αρχικά βρέθηκαν λεμφοκύτταρα και στη συνέχεια (D2 και D3) πληθώρα ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων και πολύ μικρός αριθμός ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων (98% και 2%, αντίστοιχα). Παράλληλα, στα δείγματα εκκρίματος όλων των ζώων (5/5) παρατηρήθηκαν βάκιλοι (Εικόνες V.1.β,γ).

Ομάδα Β: ενοφθαλμισμένες θηλές και σύστοιχοι μαστικοί αδένες

Οι προβατίνες της ομάδας Β, εκτός από αυτήν στην οποία έγινε ευθανασία 5 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό, εκδήλωσαν κλινική μαστίτιδα (2/3). Συγκεκριμένα, εκδήλωσαν πυρετό (έως 40,3 °C), ανορεξία, κατάπτωση, χλωρότητα στο σύστοιχο άκρο και ατονία της μεγάλης κοιλίας. Τα κλινικά συμπτώματα διατηρήθηκαν μέχρι την ευθανασία των ζώων.

Τα κλινικά ευρήματα στους μαστικούς αδένες των ζώων (2/3) ήταν έντονα και χαρακτηριστικά της κλινικής μαστίτιδας από *M. haemolytica*, παρόμοια δε με αυτά που αναφέρθηκαν προηγουμένως (Κεφάλαιο III, Τμήμα Β) σε ζώα, τα οποία είχαν ενοφθαλιστεί στο μαστικό παρέγχυμα (Εικόνα V.2.α). Το μαστικό έκκριμα αρχικά ήταν ορώδες και περιείχε πύργματα και στη συνέχεια ήταν πυώδες. Στις θηλές παρατηρήθηκαν μόνον οι αλλοιώσεις της θηλωμάτωσης (Εικόνα V.2.α).

Από το μαστικό έκκριμα όλων των ζώων (3/3) απομονώθηκε *M. haemolytica* σε καθαρή καλλιέργεια για όλη τη διάρκεια του πειραματισμού.

Η δοκιμή CMT ήταν θετική (>"1") σε όλα τα δείγματα μαστικού εκκρίματος από όλα τα ζώα από 5 ώρες μετά τον ενοφθαλισμό έως την ευθανασία τους.

Στα επιχρίσματα μαστικού εκκρίματος παρατηρήθηκαν τα παρακάτω. Σε αυτά από το ζώο στο οποίο έγινε ευθανασία 5 ώρες μετά τον ενοφθαλισμό βρέθηκαν ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα (100%). Σε αυτά από το ζώο στο οποίο έγινε ευθανασία την D1, δε βρέθηκαν λευκοκύτταρα. Σε αυτά από το ζώο στο οποίο έγινε ευθανασία την D3, αρχικά βρέθηκαν ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα (100%) (Εικόνα V.2.β) και στη συνέχεια ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα και λεμφοκύτταρα (98% και 2%, αντίστοιχα). Παράλληλα, στα δείγματα εκκρίματος όλων των ζώων (3/3) παρατηρήθηκαν βάκιλοι (Εικόνα V.2.β).

Ομάδες Α και Β: μη ενοφθαλισμένες θηλές και σύστοιχοι μαστικοί αδένες

Στις μη ενοφθαλισμένες θηλές των πειραματοζώων των ομάδων Α και Β βρέθηκαν μόνον οι αλλοιώσεις του λοιμώδους εκθύματος ή της θηλωμάτωσης, αντίστοιχα. Από κανένα δείγμα μαστικού εκκρίματος από αυτούς τους μαστικούς αδένες δεν απομονώθηκαν βακτήρια.

Η δοκιμή CMT δεν ήταν θετική σε κανένα δείγμα μαστικού εκκρίματος. Στα επιχρίσματα του μαστικού εκκρίματος δε βρέθηκαν λευκοκύτταρα.

2ος πειραματισμός

Ομάδα Γ: ενοφθαλισμένες θηλές και σύστοιχοι μαστικοί αδένες

Οι προβατίνες της ομάδας Γ, εκτός από αυτήν στην οποία έγινε ευθανασία 2 ώρες μετά τον ενοφθαλισμό, εκδήλωσαν κλινική μαστίτιδα (6/7) 5 ώρες μετά τον ενοφθαλισμό. Συγκεκριμένα, εκδήλωσαν πυρετό (έως 42,1 °C), αδιαφορία προς το περιβάλλον, χλωρότητα στα σύστοιχο οπίσθιο άκρο και ατονία της μεγάλης κοιλίας. Τα κλινικά συμπτώματα διατηρήθηκαν μέχρι την ευθανασία των ζώων.

Τα κλινικά ευρήματα στους μαστικούς αδένες των ζώων (6/7) ήταν έντονα και χαρακτηριστικά της κλινικής μαστίτιδας από *M. haemolytica*, παρόμοια δε με αυτά που αναφέρθηκαν προηγουμένως (Κεφάλαιο III, Τμήμα Β) σε ζώα, τα οποία είχαν ενοφθαλιστεί στο μαστικό παρέγχυμα (Εικόνα V.3.α). Το μαστικό έκκριμα ήταν ορώδες στην αρχή οροαιμορραγικό, πυώδες ή με πύργματα στη συνέχεια. Οι ενοφθαλισμένες θηλές ήταν ερυθρές και σκληρές, η δε άρμεξή τους γινόταν με δυσκολία.

Από το μαστικό έκκριμα όλων των ζώων (7/7) απομονώθηκε *M. haemolytica* σε καθαρή καλλιέργεια για όλη τη διάρκεια του πειραματισμού.

Η δοκιμή CMT ήταν θετική (>"1") σε όλα τα δείγματα μαστικού εκκρίματος από όλα τα ζώα από την πρώτη δειγματοληψία έως την ευθανασία τους.

Στα επιχρίσματα μαστικού εκκρίματος παρατηρήθηκαν τα παρακάτω. Σε αυτά από το ζώο στο οποίο έγινε ευθανασία 2 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό, βρέθηκαν μακροφάγα που είχαν φαγοκυτταρώσει βακίλους (100%). Σε αυτά από το ζώο στο οποίο έγινε ευθανασία 5 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό, βρέθηκαν μακροφάγα, ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα και ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα (20%, 45% και 35%, αντίστοιχα). Σε αυτά από το ζώο στο οποίο έγινε ευθανασία 12 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό, βρέθηκαν μακροφάγα και ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα (99% και 1%, αντίστοιχα). Στα επιχρίσματα από τα ζώα στα οποία έγινε ευθανασία αργότερα, βρέθηκαν αρχικά ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα (100%) και στη συνέχεια (D1 και αργότερα) λεμφοκύτταρα, ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα και μακροφάγα. Παράλληλα, στα δείγματα εκκρίματος όλων των ζώων (7/7) παρατηρήθηκαν βάκιλοι (Εικόνες V.3.β,γ,δ,ε).

Ομάδα Δ: ενοφθαλμισμένες θηλές και σύστοιχοι μαστικοί αδένες

Οι προβατίνες της ομάδας Δ, εκτός από αυτήν στην οποία έγινε ευθανασία την D1, εκδήλωσαν κλινική μαστίτιδα (3/4) 36 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό. Συγκεκριμένα, εκδήλωσαν πυρετό (έως 42,0 °C), αδιαφορία προς το περιβάλλον, χλωρότητα στο σύστοιχο οπίσθιο άκρο και ατονία της μεγάλης κοιλίας. Τα κλινικά συμπτώματα διατηρήθηκαν μέχρι την ευθανασία των ζώων.

Τα κλινικά ευρήματα στους μαστικούς αδένες των ζώων (3/4) ήταν έντονα και χαρακτηριστικά της κλινικής μαστίτιδας από *M. haemolytica*, παρόμοια δε με αυτά που αναφέρθηκαν προηγουμένως (Κεφάλαιο III, Τμήμα Β) σε ζώα, τα οποία είχαν ενοφθαλμιστεί στο μαστικό παρέγχυμα. Το μαστικό έκκριμα ήταν ορώδες ή οροαιμορραγικό. Οι ενοφθαλμισμένες θηλές ήταν ερυθρές και σκληρές, η δε άρμεξή τους γινόταν με δυσκολία.

Από το μαστικό έκκριμα όλων των ζώων (4/4) απομονώθηκε *M. haemolytica* σε καθαρή καλλιέργεια για όλη τη διάρκεια του πειραματισμού. Από τα δείγματα υλικού από το θηλαίο πόρο όλων των ζώων (4/4) απομονώθηκε σε καθαρή καλλιέργεια *M. haemolytica* για όλη τη διάρκεια του πειραματισμού.

Η δοκιμή CMT ήταν θετική (>"1") σε όλα τα δείγματα μαστικού εκκρίματος από όλα τα ζώα από την πρώτη δειγματοληψία έως την ευθανασία τους.

Στα επιχρίσματα μαστικού εκκρίματος παρατηρήθηκαν τα παρακάτω. Σε αυτά από το ζώο στο οποίο έγινε ευθανασία την D1, δε βρέθηκαν λευκοκύτταρα. Σε αυτά από το ζώο στο οποίο έγινε ευθανασία την D2, βρέθηκαν αρχικά ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα και μακροφάγα (70% και 30%, αντίστοιχα), ενώ στη συνέχεια (D2) βρέθηκε αύξηση της αναλογίας των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων και μείωση αυτής των μακροφάγων (90% και 10%, αντίστοιχα). Τέλος, σε αυτά από το ζώο στο οποίο έγινε ευθανασία την D4, βρέθηκαν ουδετερόφιλα

λευκοκύτταρα και λεμφοκύτταρα (85% και 15%, αντίστοιχα). Παράλληλα, στα δείγματα εκκρίματος όλων των ζώων εκτός από αυτό στο οποίο έγινε ευθανασία την D1 (3/4), παρατηρήθηκαν βάκιλοι.

Ομάδες Γ και Δ: μη ενοφθαλμισμένες θηλές και σύστοιχοι μαστικοί αδένες

Μία προβατίνα από την ομάδα Γ εκδήλωσε κλινική μαστίτιδα (D2) στο σύστοιχο της ενοφθαλμισμένης θηλής μαστικό αδέν. Η ετερόπλευρη θηλή του ζώου δεν είχε παθολογικά ευρήματα, άλλα εκτός από τις αλλοιώσεις τύπου "charring". Από το μαστικό έκκριμα απομονώθηκε *M. haemolytica* σε καθαρή καλλιέργεια από την D2. Η δοκιμή CMT ήταν θετική στα δείγματα μαστικού εκκρίματος. Στα επιχρίσματα μαστικού εκκρίματος υπήρχαν ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα και παράλληλα, παρατηρήθηκαν βάκιλοι.

Στις μη ενοφθαλμισμένες θηλές των άλλων πειραματοζώων των ομάδων Γ και Δ βρέθηκαν μόνον οι αλλοιώσεις τύπου "charring". Από κανένα δείγμα υλικού θηλαίου πόρου (ζώα ομάδας Δ) ή μαστικού εκκρίματος δεν απομονώθηκαν βακτήρια. Από τα δείγματα από το δέρμα των θηλών (ζώα ομάδας Δ), απομονώθηκε μία ποικιλία βακτηρίων (κυρίως πηκτάση-αρνητικοί Σταφυλόκοκκοι και *Bacillus* spp.), όχι όμως *M. haemolytica*.

Η δοκιμή του CMT ήταν θετική σε όλα τα δείγματα μαστικού εκκρίματος από όλα τα ζώα. Στα επιχρίσματα μαστικού εκκρίματος βρέθηκαν λίγα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα και μακροφάγα (80% και 20%, αντίστοιχα).

Μάρτυρες

Ομάδες Ε και ΣΤ: ενοφθαλμισμένες θηλές και σύστοιχοι μαστικοί αδένες

Κανένα από τα ζώα (0/8) που αποτελούσαν τους μάρτυρες δεν εκδήλωσε κλινική μαστίτιδα.

Μετά τον ενοφθαλμισμό, από 51% των δειγμάτων μαστικού εκκρίματος και από 40% των δειγμάτων υλικού από το θηλαίο πόρο ή το δέρμα (ομάδα ΣΤ) απομονώθηκε *M. haemolytica* σε καθαρή καλλιέργεια.

Η δοκιμή CMT ήταν θετική (≥ 1) σε όλα τα δείγματα μαστικού εκκρίματος από την D1 (ομάδα Ε) ή την D4 (ομάδα ΣΤ).

Στα επιχρίσματα μαστικού εκκρίματος από τις προβατίνες της ομάδας Ε βρέθηκαν αρχικά κυρίως ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα (>80%). Στη συνέχεια, η αναλογία τους μειώθηκε (50 έως 60%) και αυξήθηκε αυτή των μακροφάγων και των λεμφοκυττάρων (5-35% και 10-30% αντίστοιχα). Στα δείγματα μαστικού εκκρίματος από τις προβατίνες της ομάδας ΣΤ βρέθηκαν κυρίως, ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα ($\geq 85\%$).

Ομάδες Ε και ΣΤ: μη ενοφθαλμισμένες θηλές και σύστοιχοι μαστικοί αδένες

Στις μη ενοφθαλμισμένες θηλές των πειραματοζώων των ομάδων Ε και ΣΤ δεν βρέθηκαν παθολογικά ευρήματα. Από κανένα δείγμα υλικού θηλαίου πόρου (ζώα ομάδας ΣΤ) ή μαστικού εκκρίματος δεν απομονώθηκαν βακτήρια. Από τα δείγματα από το δέρμα της θηλής

(ομάδα ΣΤ), απομονώθηκε μία ποικιλία βακτηρίων (κυρίως πηκτάση αρνητικοί Σταφυλόκοκκοι), όχι όμως *M. haemolytica*.

Σε κανένα δείγμα μαστικού εκκρίματος, η δοκιμή CMT δεν ήταν θετική. Στα επιχρίσματα του μαστικού εκκρίματος δε βρέθηκαν λευκοκύτταρα.

Τα βακτηριολογικά ευρήματα και τα αποτελέσματα της δοκιμής CMT κατά τη διάρκεια του πειραματισμού παρουσιάζονται στον Πίνακα V.iii.

Ανάλυση

1ος πειραματισμός

Η πιθανότητα να εκδηλωθεί μαστίτιδα στο σύστοιχο προς την ενοφθαλμισμένη θηλή μαστικό αδένα ήταν σημαντικά μεγαλύτερη από αυτή στον ετερόπλευρο μαστικό αδένα των ίδιων ζώων ($P < 0,001$). Υπήρχε επίσης σημαντική διαφορά στην πιθανότητα εκδήλωσης κλινικής μαστίτιδας μεταξύ των προβάτων που ενοφθαλμίστηκαν και των μαρτύρων ($P < 0,005$). Όταν συμπεριελήφθησαν στην ανάλυση και οι προβατίνες του πειραματισμού που περιγράφεται στο Κεφάλαιο III, Τμήμα Β, τότε η διαφορά στην πιθανότητα εκδήλωσης κλινικής μαστίτιδας ήταν μεγαλύτερη ($P < 0,001$). Η πιθανότητα που είχε μία προβατίνα με αλλοιώσεις λοιμώδους εκθύματος ή θηλωμάτωσης να αναπτύξει κλινική μαστίτιδα ήταν 100% (97,5% διάστημα εμπιστοσύνης: 54,1% έως 100%).

2ος πειραματισμός

Η πιθανότητα να εκδηλωθεί μαστίτιδα στο σύστοιχο προς την ενοφθαλμισμένη θηλή μαστικό αδένα ήταν σημαντικά μεγαλύτερη από αυτή στον άλλο μαστικό αδένα των ίδιων ζώων (ομάδα Γ: $P < 0,001$, ομάδα Δ: $P = 0,03$). Υπήρχε επίσης σημαντική διαφορά στην εκδήλωση κλινικής μαστίτιδας μεταξύ των προβάτων που ενοφθαλμίστηκαν και των μαρτύρων (ομάδα Γ: $P = 0,005$, ομάδα Δ: $P = 0,07$). Όταν συμπεριελήφθησαν στην ανάλυση και οι προβατίνες του πειραματισμού που περιγράφεται στο Κεφάλαιο III, Τμήμα Β, τότε η διαφορά στην πιθανότητα εκδήλωσης κλινικής μαστίτιδας ήταν μεγαλύτερη (ομάδα Γ: $P < 0,001$, ομάδα Δ: $P = 0,002$). Η πιθανότητα που είχε μία προβατίνα με αλλοιώσεις τύπου "chapping" να αναπτύξει κλινική μαστίτιδα ήταν 100% (97,5% διάστημα εμπιστοσύνης: 63,1% έως 100%).

Πίνακας V.iii. Διαδοχικά ευρήματα κλινικής εξέτασης (εκδήλωση κλινικής μαστίπδας), βακτηριολογικής εξέτασης (απομόνωση *M. haemolytica*) και δοκιμής CMT (\geq "1") σε δείγματα από προβατίνες, των οποίων η θηλή είχε ενοφθαλμιστεί με το βακτήριο.

	Χρόνος μετά τον ενοφθαλμισμό					
	D0					
	2 h	5 h	12 h	18 h		
					D1	
					D2	
					D3	
					D4	
Ομάδα Α						
Κλιν. ευρήμ.	0/5	4/4	3/3	2/2	2/2	1/1
Βακτ. ευρήμ. (με)	5/5	4/4	3/3	2/2	2/2	1/1
CMT	0/5	4/4	3/3	2/2	2/2	1/1
Ομάδα Β						
Κλιν. ευρήμ.	0/3	0/3	0/2	0/2	2/2	1/1
Βακτ. ευρήμ. (με)	3/3	3/3	2/2	2/2	2/2	1/1
CMT	0/3	3/3	2/2	2/2	2/2	1/1
Ομάδα Γ						
Κλιν. ευρήμ.	0/7	6/6	5/5	4/4	4/4	3/3
Βακτ. ευρήμ. (με)	7/7	6/6	5/5	4/4	4/4	3/3
CMT	7/7	6/6	5/5	4/4	4/4	3/3
Ομάδα Δ						
Κλιν. ευρήμ.	0/4	0/4	0/4	0/4	3/4	3/3
Βακτ. ευρήμ. (με)	-	-	-	4/4	4/4	3/3
Βακτ. ευρήμ. (υθπ)	-	-	-	4/4	4/4	3/3
Βακτ. ευρήμ. (δέρμα θηλ.)	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	3/3
CMT	-	-	-	4/4	4/4	3/3
Ομάδα Ε						
Κλιν. ευρήμ.	0/5	0/5	0/5	0/4	0/4	0/3
Βακτ. ευρήμ. (με)	0/5	0/5	2/5	4/4	4/4	3/3
CMT	0/5	0/5	4/5	4/4	4/4	3/3

Πίνακας V.iii. Διαδοχικά ευρήματα κλινικής εξέτασης (εκδήλωση κλινικής μαστίπιδας), βακτηριολογικής εξέτασης (απομόνωση *M. haemolytica*) και δοκιμής CMT (\geq "1") σε δείγματα από προβατίνες, των οποίων η θηλή είχε ενοφθαλμιστεί με το βακτήριο.

Ομάδα ΣΤ	Χρόνος μετά τον ενοφθαλμισμό						
	D0			D1	D2	D3	D4
	2 h	5 h	12 h				
Κλιν. ευρήμ.	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/1	0/1
Βακτ. ευρήμ. (με)	-	-	-	0/2	1/2	1/1	1/1
Βακτ. ευρήμ. (υθπ)	-	-	-	0/2	2/2	1/1	1/1
Βακτ. ευρήμ. (δέρμα θηλ.)	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/1	1/1
CMT	-	-	-	0/2	2/2	1/1	1/1

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

α. Απομόνωση *M. haemolytica* σε σύμμεικτη καλλιέργεια.

Κλιν. ευρήμ.: κλινικά ευρήματα, Βακτ. ευρήμ.: βακτηριολογικά ευρήματα, με: μαστικό έκκριμα, υθπ: υλικό από το θηλαίο πόρο, δέρμα θηλ.: δέρμα θηλής, CMT: αποτελέσματα δοκιμής CMT (\geq "1").

Μακροσκοπικά νεκροτομικά ευρήματα

Κατά τη μέτρηση του μήκους του αυλού της θηλής (ζώα των ομάδων Α, Β, Γ και Ε) διαπιστώθηκε ότι το ενοφθάλμισμα είχε τοποθετηθεί πάντα στο θηλαίο πόρο.

Από τα δείγματα από τα εσωτερικά όργανα των ζώων δεν απομονώθηκαν βακτήρια. Από τα δείγματα ιστών των ενοφθαλισμένων θηλών και των σύστοιχων μαστικών αδένων απομονώθηκε *M. haemolytica* σε καθαρή καλλιέργεια (Πίνακας V.iv). Το βακτήριο επίσης απομονώθηκε από τα επιχώρια λεμφογάγγλια των ζώων των ομάδων Α, Β, Γ και Δ, στα οποία έγινε ευθανασία μετά από 12 ώρες μετά τον ενοφθαλισμό.

Πίνακας V.iv. Μεταθανάτια απομόνωση *M. haemolytica* από προβατίνες, των οποίων η θηλή είχε ενοφθαλιστεί με το βακτήριο.

Σημείο απομόνωσης	Χρονικό σημείο ευθανασίας της προβατίνας						
	D0			D1	D2	D3	D4
	2 h	5 h	12 h				
Ομάδα Α							
Θηλ. πόρος	+	+	+	+		+	
Θηλ. κόλπος	+	+	+	+		+	
Μασ. παρέγχ.	-	+	+	+		+	
Ομάδα Β							
Θηλ. πόρος		+		+		+	
Θηλ. κόλπος		+		+		+	
Μασ. παρέγχ.		+		+		+	
Ομάδα Γ							
Θηλ. πόρος	+	+	+	+	+	+	+
Θηλ. κόλπος	+	+	+	+	+	+	+
Μασ. παρέγχ.	-	+	+	+	+	+	+
Ομάδα Δ							
Θηλ. πόρος				+	+	+	+
Θηλ. κόλπος				+	+	+	+
Μασ. παρέγχ.				+	+	+	+
Ομάδα Ε							
Θηλ. πόρος			+	+	+	+	+
Θηλ. κόλπος			-	-	+	+	+
Μασ. παρέγχ.			-	-	-	-	+
Ομάδα ΣΤ							
Θηλ. πόρος					+		+
Θηλ. κόλπος					-		+
Μασ. παρέγχ.					-		-

Θηλ. πόρος: θηλαίος πόρος, Θηλ. κόλπος: θηλαίος κόλπος, Μασ. παρέγχ.: μαστικό παρέγχυμα.

Στην ομάδα Γ, το βακτήριο απομονώθηκε επίσης από το σύστοιχο προς τη μη ενοφθαλμισμένη θηλή, μαστικό παρέγχυμα της προβατίνας, στην οποία έγινε ευθανασία 4 ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό. Όμως, από το θηλαίο πόρο και το θηλαίο κόλπο αυτού του ζώου, δεν απομονώθηκαν βακτήρια. Από τα δείγματα ιστών από τις μη ενοφθαλμισμένες θηλές και τους σύστοιχους μαστικούς αδένες των άλλων ζώων δεν απομονώθηκαν βακτήρια.

Η διάμεσος τιμή του αθροίσματος του αριθμού των σημείων δειγματοληψίας, από τα οποία απομονώθηκαν βακτήρια, για (i) τις ομάδες Α-Δ και (ii) τις ομάδες Ε-ΣΤ, παρουσιάζεται ως γραφική παράσταση (στον άξονα x παρουσιάζεται ο χρόνος μετά τον ενοφθαλμισμό των ζώων) (Εικόνα V.5).

1ος πειραματισμός

Ομάδες Α και Β: ενοφθαλμισμένες θηλές και σύστοιχοι μαστικοί αδένες

Δεν παρατηρήθηκαν αλλοιώσεις σε άλλα όργανα, εκτός από τη θηλή, το μαστικό αδένα και τα επιχώρια λεμφογάγγλια.

Στις ενοφθαλμισμένες θηλές όλων των ζώων τα κύρια μακροσκοπικά ευρήματα ήταν οι πτυχώσεις, η υπεραιμία και η πάχυνση του βλεννογόνου του θηλαίου κόλπου. Η χαρακτηριστική εσωτερική δομή της θηλής, με το σαφή διαχωρισμό θηλαίου πόρου - θηλαίου κόλπου, είχε χαθεί (Εικόνα V.1.δ & V.2.γ).

Κατά τη μακροσκοπική νεκροτομική εξέταση του μαστικού παρεγχύματος των ζώων, στα οποία έγινε ευθανασία 2 ώρες (ομάδα Α) ή 5 ώρες (ομάδα Α και ομάδα Β) μετά τον ενοφθαλμισμό, αυτό φαινόταν φυσιολογικό. Στο μαστικό παρέγχυμα των άλλων ζώων παρατηρήθηκαν οι χαρακτηριστικές αλλοιώσεις μαστίπιδας από *M. haemolytica*. Τα κύρια ευρήματα ήταν υποδόριο οίδημα και υποδόριο εμφύσημα στο μαστικό αδένα, περιοχές με αιμορραγίες στο παρέγχυμα και παρουσία πυώδους συλλογής σε διάφορα σημεία του παρεγχύματος (Εικόνα V.1.ε & V.2.δ). Επίσης, παρατηρήθηκε συμφόρηση και διάταση των αγγείων. Στους γαλακτοφόρους πόρους υπήρχαν πύγματα γάλακτος και ινική. Οι γαλακτοφόροι πόροι και ο γαλακτοφόρος κόλπος περιείχαν συσσωματώματα εξιδρώματος, ινική και θρόμβους αίματος. Τα επιχώρια λεμφογάγγλια ήταν έντονα διογκωμένα και οιδηματικά.

Ομάδες Α και Β: μη ενοφθαλμισμένες θηλές και σύστοιχοι μαστικοί αδένες

Σε καμία από τις μη ενοφθαλμισμένες θηλές και το σύστοιχο μαστικό παρέγχυμα δεν βρέθηκαν μακροσκοπικά νεκροτομικά ευρήματα.

2ος πειραματισμός

Ομάδες Γ και Δ: ενοφθαλμισμένες θηλές και σύστοιχοι μαστικοί αδένες

Στο ζώο της ομάδας Γ στο οποίο έγινε ευθανασία την ημέρα D3 μετά τον ενοφθαλμισμό παρατηρήθηκαν συλλογή οροαιμορραγικού υγρού στην περικαρδιακή κοιλότητα και πετέχειες στο μυοκάρδιο (Εικόνα V.4.α,β). Στα άλλα ζώα των δύο ομάδων, δεν παρατηρήθηκαν αλλοιώσεις σε άλλα όργανα, εκτός από τη θηλή, το μαστικό αδένα και τα επιχώρια λεμφογάγγλια.

Στις ενοφθαλμισμένες θηλές όλων των ζώων τα κύρια μακροσκοπικά ευρήματα ήταν οι πτυχώσεις, η υπεραιμία και η πάχυνση του βλεννογόνου του θηλαίου κόλππου (Εικόνα V.3.στ). Η χαρακτηριστική εσωτερική δομή της θηλής, με το σαφή διαχωρισμό θηλαίου πόρου - θηλαίου κόλππου, είχε χαθεί.

Κατά τη μακροσκοπική νεκροτομική εξέταση του μαστικού παρεγχύματος των ζώων της ομάδας Γ, στα οποία έγινε ευθανασία 2 ή 5 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό, αυτό φαινόταν φυσιολογικό. Επίσης, κατά τη μακροσκοπική νεκροτομική εξέταση του μαστικού παρεγχύματος του ζώου της ομάδας Δ, στο οποίο έγινε ευθανασία την D1, αυτό φαινόταν φυσιολογικό. Στο μαστικό παρέγχυμα των άλλων ζώων παρατηρήθηκαν οι χαρακτηριστικές αλλοιώσεις μαστίτιδας από *M. haemolytica*, όπως περιγράφηκαν παραπάνω (Εικόνα V.3.ζ & V.4.γ). Τα επιχώρια λεμφογάγγλια ήταν έντονα διογκωμένα και οίδηματικά.

Ομάδα Γ και Δ: μη ενοφθαλμισμένες θηλές και σύστοιχοι μαστικοί αδένες

Στον ετερόπλευρο μαστικό αδένα της προβατίνας της ομάδας Γ, στην οποία έγινε ευθανασία την D4, παρατηρήθηκαν αλλοιώσεις όμοιες με αυτές που περιγράφηκαν παραπάνω (Εικόνα V.3.ζ). Όμως, στη σύστοιχη θηλή δεν παρατηρήθηκαν αλλοιώσεις.

Σε καμία από τις υπόλοιπες μη ενοφθαλμισμένες θηλές και το σύστοιχο μαστικό παρέγχυμα δε βρέθηκαν μακροσκοπικά νεκροτομικά ευρήματα.

Μάρτυρες

Ομάδες Ε και ΣΤ: ενοφθαλμισμένες θηλές και σύστοιχοι μαστικοί αδένες

Δεν παρατηρήθηκαν παθολογικά ευρήματα στα εσωτερικά όργανα, στη θηλή και το μαστικό παρέγχυμα.

Ομάδες Ε και ΣΤ: μη ενοφθαλμισμένες θηλές και σύστοιχοι μαστικοί αδένες

Σε καμία από τις μη ενοφθαλμισμένες θηλές και το σύστοιχο μαστικό παρέγχυμα, δεν υπήρχαν μακροσκοπικά νεκροτομικά ευρήματα.

Ιστοπαθολογικά ευρήματα

1ος πειραματισμός

Ομάδα Α: ενοφθαλμισμένες θηλές και σύστοιχοι μαστικοί αδένες

Το κύριο ιστοπαθολογικό εύρημα στις θηλές ήταν διάχυτη υποβλεννογόνια διήθηση από ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα. Αυτό παρατηρήθηκε στα ζώα στα οποία έγινε ευθανασία 5 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό και αργότερα. Επίσης, παρατηρήθηκαν διήθηση από λεμφοκύτταρα, παρουσία πλασμοκυττάρων και εξαγγείωση σε όλο το επιθήλιο και μέσα στον αυλό της θηλής, καθώς και λύση των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων και καταστροφή των επιθηλιακών κυττάρων του βλεννογόνου της θηλής. Σημειώνεται ότι στις θηλές αυτές δεν παρατηρήθηκαν συναθροίσεις λεμφοκυττάρων στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου (Εικόνα V.1.στ).

Το κύριο ιστοπαθολογικό εύρημα στο σύστοιχο προς την ενοφθαλμισμένη θηλή μαστικό παρέγχυμα ήταν διήθηση από ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα. Άλλες αλλοιώσεις ήταν εξαγγείωση και πλήρης καταστροφή της δομής του μαστικού παρεγχύματος, καθώς και διήθηση από ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα και καταστροφή επιθηλιακών κυττάρων. Στη συνέχεια, παρατηρήθηκαν λεμφοκυτταρική διήθηση, αιμορραγίες και καταστροφή των αδενοκυψελίδων (Εικόνα V.1.ζ).

Ομάδα Β: ενοφθαλμισμένες θηλές και σύστοιχοι μαστικοί αδένες

Το κύριο ιστοπαθολογικό εύρημα στις θηλές ήταν διάχυτη υποβλεννογόνια διήθηση από ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα (Εικόνα V.2.ε). Στο ζώο στο οποίο έγινε ευθανασία την D1, παρατηρήθηκε επίσης καταστροφή της επιδερμίδας της θηλής. Στο ζώο στο οποίο έγινε ευθανασία την D3, παρατηρήθηκε επίσης διήθηση από λεμφοκύτταρα και πλασμοκύτταρα. Σημειώνεται ότι στις θηλές αυτές δεν παρατηρήθηκε λεμφικός ιστός στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου (Εικόνα V.2.ε).

Τα ιστοπαθολογικά ευρήματα στο μαστικό παρέγχυμα των ζώων της ομάδας αυτής ήταν παρόμοια με αυτά των ζώων της ομάδας Α. Μεταξύ άλλων παρατηρήθηκαν λεμφοκυτταρική διήθηση, αιμορραγίες και καταστροφή της δομής του μαστικού παρεγχύματος (Εικόνα V.2.στ).

Ομάδα Α και Β: μη ενοφθαλμισμένες θηλές και σύστοιχοι μαστικοί αδένες

Σε καμία από τις μη ενοφθαλμισμένες θηλές και το σύστοιχο μαστικό παρέγχυμα δεν υπήρχαν ιστοπαθολογικά ευρήματα.

2ος πειραματισμός

Ομάδα Γ: ενοφθαλμισμένες θηλές και σύστοιχοι μαστικοί αδένες

Στις θηλές των ζώων αυτών παρατηρήθηκε αρχικά (ζώα στα οποία έγινε ευθανασία 5 ώρες και 12 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό) διήθηση από λεμφοκύτταρα στο θηλαίο κόλπο και από μικρό αριθμό ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων και λεμφοκυττάρων στο θηλαίο πόρο. Στη συνέχεια (ζώο στο οποίο έγινε ευθανασία την D1), βρέθηκε στο θηλαίο κόλπο υποβλεννογόνια διήθηση από αυξημένο αριθμό ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων, ενώ παράλληλα παρατηρήθηκαν λεμφοκύτταρα στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου. Προοδευτικά (ζώα στα οποία έγινε ευθανασία την D2 και αργότερα), μειώθηκε ο αριθμός των λευκοκυττάρων, αλλά η αναλογία τους και η κατανομή τους στους ιστούς παρέμειναν ίδιες. Σε όλες τις θηλές, στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου, παρατηρήθηκε συνάθροιση λεμφοκυττάρων με εικόνα χαρακτηριστική λεμφοζιδίου, με ή χωρίς ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα και βλαστική δραστηριότητα. Στο δέρμα των θηλών παρατηρήθηκαν έλκη και διαβρώσεις, εξιδρωματικές εφελκίδες και λευκοκυτταρική συσσώρευση. Σημειώνεται ότι οι δερματικές αλλοιώσεις δεν επεκτείνονταν έως το εσωτερικό της θηλής, δηλαδή στο θηλαίο πόρο ή το θηλαίο κόλπο, καθώς το μέγιστο βάθος τους ήταν έως 1,5 mm, οι δε υποκείμενοι ιστοί ήταν άθικτοι.

Τα ιστοπαθολογικά ευρήματα στο μαστικό παρέγχυμα των ζώων της ομάδας αυτής ήταν αρχικά (ζώα στα οποία έγινε ευθανασία 5 ώρες και 12 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό) έντονη διήθηση από ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα. Στη συνέχεια (ζώα στα οποία έγινε ευθανασία την D1 ή την D2), παρατηρήθηκαν εξαγγείωση, αιμορραγίες, λύση των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων και καταστροφή των επιθηλιακών κυττάρων και των αδενοκυψελίδων. Τέλος (ζώα στα οποία έγινε ευθανασία την D3 ή την D4), παρατηρήθηκε πλήρης απώλεια της δομής του παρεγχύματος.

Ομάδα Δ: ενοφθαλμισμένες θηλές και σύστοιχοι μαστικοί αδένες

Τα ιστοπαθολογικά ευρήματα στις ενοφθαλμισμένες θηλές και το σύστοιχο μαστικό παρέγχυμα των ζώων της ομάδας αυτής ήταν παρόμοια με αυτά στα ζώα της ομάδας Γ, όμως έγιναν αντιληπτά για πρώτη φορά στο ζώο στο οποίο έγινε ευθανασία την D1. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν και αρκετά συσσωματώματα βακίλων στην εξωτερική επιφάνεια της επιδερμίδας των θηλών.

Ομάδα Γ και Δ: μη ενοφθαλμισμένες θηλές και σύστοιχοι μαστικοί αδένες

Στον ετερόπλευρο μαστικό αδένα της προβατίνας της ομάδας Γ, στην οποία έγινε ευθανασία την D4, παρατηρήθηκαν λευκοκυτταρική διήθηση, εξαγγείωση, αιμορραγίες, λύση

των λευκοκυττάρων και καταστροφή των επιθηλιακών κυττάρων και των αδενοκυψελίδων. Όμως, στη σύστοιχη θηλή δεν παρατηρήθηκαν αλλοιώσεις.

Σε καμία από τις άλλες μη ενοφθαλισμένες θηλές και το σύστοιχο μαστικό παρέγχυμα δεν υπήρχαν ιστοπαθολογικά ευρήματα άλλα από αυτά που σχετίζονταν με τις αλλοιώσεις τύπου "charring" και υπήρχαν στο δέρμα των θηλών (έλκη και διαβρώσεις, εξιδρωματικές εφελκίδες και λευκοκυτταρική συσσώρευση).

Μάρτυρες

Ομάδες Ε και ΣΤ: ενοφθαλισμένες θηλές και σύστοιχοι μαστικοί αδένες

Στις θηλές των ζώων της ομάδας Ε παρατηρήθηκε μαζική λευκοκυτταρική διήθηση (λεμφοκύτταρα και πλασμοκύτταρα) στο βλεννογόνο του θηλαίου πόρου και του θηλαίου κόλπου. Επιπλέον, στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου παρατηρήθηκε συνάθροιση λεμφοκυττάρων με εικόνα χαρακτηριστική λεμφοζιδίου, με ή χωρίς ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα και βλαστική δραστηριότητα. Στις θηλές των ζώων της ομάδας ΣΤ παρατηρήθηκε στο θηλαίο πόρο διήθηση από λεμφοκύτταρα και στο θηλαίο κόλπο διήθηση από λεμφοκύτταρα και πλασμοκύτταρα. Επιπλέον, στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου παρατηρήθηκε λεμφικός ιστός με ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα και βλαστική δραστηριότητα.

Στο μαστικό παρέγχυμα των ζώων των ομάδων Ε και ΣΤ δεν παρατηρήθηκαν ιστοπαθολογικά ευρήματα.

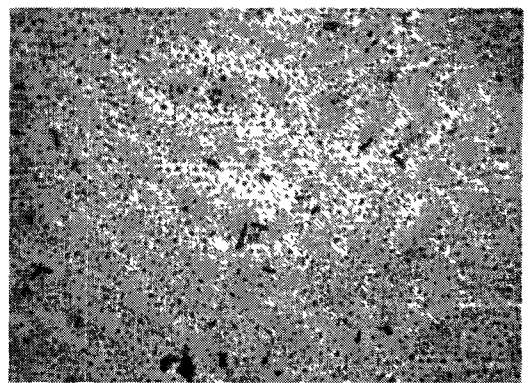
Ομάδες Ε και ΣΤ: μη ενοφθαλισμένες θηλές και σύστοιχοι μαστικοί αδένες

Σε καμία από τις μη ενοφθαλισμένες θηλές και το σύστοιχο μαστικό παρέγχυμα, δεν παρατηρήθηκαν ιστοπαθολογικά ευρήματα.

Εικόνα V.1. Κλινικά, κυτταρολογικά και παθολογοανατομικά ευρήματα σε προβατίνα ομάδας Α, στην οποία έγινε ευθανασία 2 ημέρες μετά τον ενοφθαλισμό.

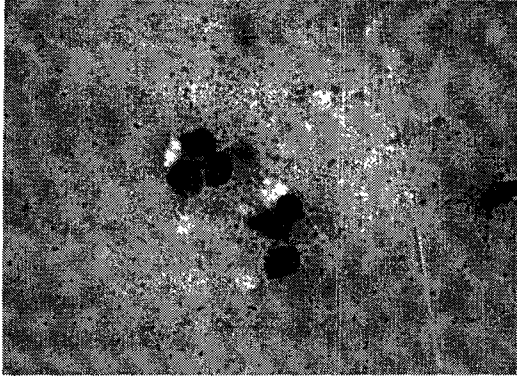


α. Διόγκωση μαστικού αδένα 12 ώρες μετά τον ενοφθαλισμό και αλλοιώσεις λοιμώδους εκθύματος στη θηλή.



β. Βάκιλοι στο μαστικό έκκριμα 5 ώρες μετά τον ενοφθαλισμό (X1000, χρώση Giemsa).

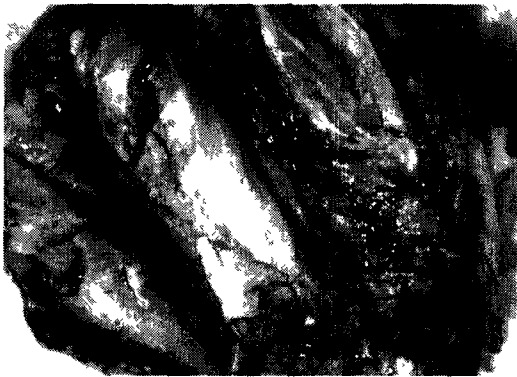
Εικόνα V.1. Κλινικά, κυτταρολογικά και παθολογοανατομικά ευρήματα σε προβατίνα ομάδας Α, στην οποία έγινε ευθανασία 2 ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό (συνέχεια).



γ. Ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα και βάκιλοι στο μαστικό έκκριμα 12 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό (Χ400, χρώση Giemsa).



δ. Πτυχώσεις, υπεραιμία, πάχυνση του βλεννογόνου του θηλαίου κόλπου και απώλεια της εσωτερικής δομής της θηλής.



ε. Εκτεταμένη αιμορραγία και πυώδης συλλογή στο μαστικό παρέγχυμα.



στ. Απουσία συναθροίσεων λεμφοκυττάρων στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου (Χ50, χρώση Η&Ε).

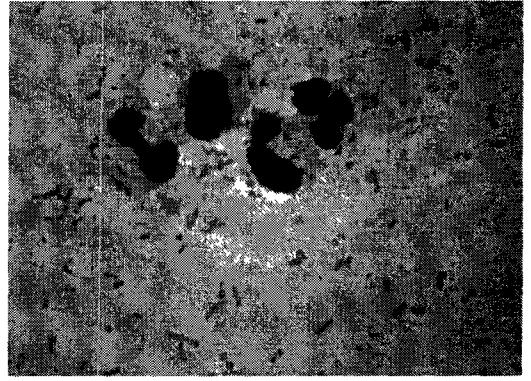


ζ. Διήθηση από λεμφοκύτταρα και καταστροφή των αδενοκυψελίδων στο μαστικό παρέγχυμα (Χ100, χρώση Η&Ε).

Εικόνα V.2. Κλινικά, κυτταρολογικά και παθολογοανατομικά ευρήματα σε προβατίνα ομάδας Β, στην οποία έγινε ευθανασία 3 ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό.



α. Διόγκωση μαστικού αδένα μία ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό και αλλοιώσεις θηλωμάτωσης στη θηλή.



β. Ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα και βάκιλοι στο μαστικό έκκριμα μία ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό (X1000, χρώση Giemsa).



γ. Πτυχώσεις και πάχυνση του βλεννογόνου του θηλαίου κόλπου, καθώς και αλλοιώσεις θηλωμάτωσης στο δέρμα της θηλής.

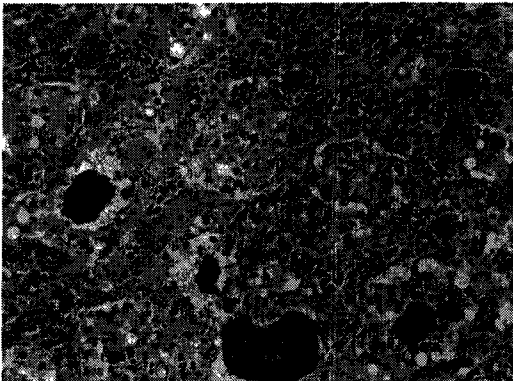
Εικόνα V.2. Κλινικά, κυτταρολογικά και παθολογοανατομικά ευρήματα σε προβατίνα ομάδας Β, στην οποία έγινε ευθανασία 3 ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό (συνέχεια).



δ. Εκτεταμένη αιμορραγία στο μαστικό παρέγχυμα.

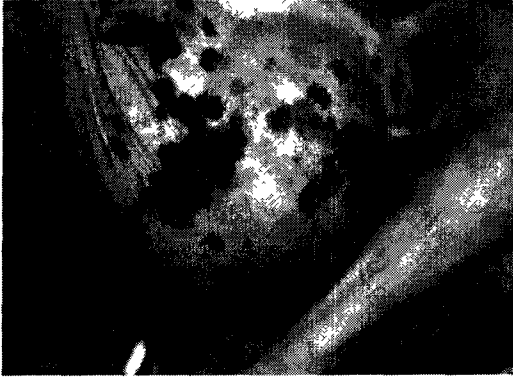


ε. Διήθηση από ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα και απουσία συναθροίσεων λεμφοκυττάρων στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου (Χ50, χρώση Η&Ε).

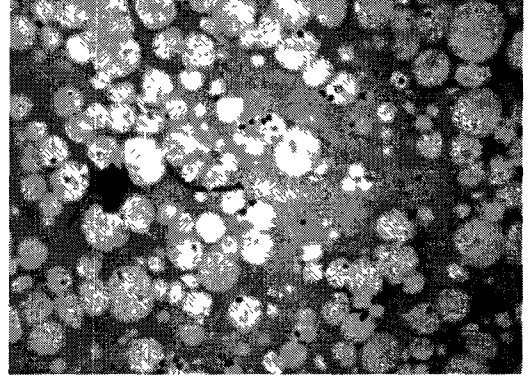


στ. Διήθηση από λεμφοκύτταρα, αιμορραγίες και καταστροφή μαστικού παρεγχύματος (Χ100, χρώση Η&Ε).

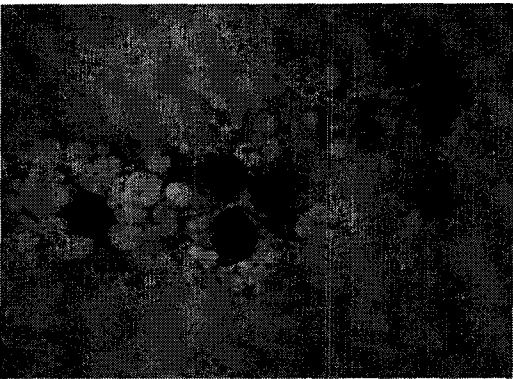
Εικόνα V.3. Κλινικά, κυτταρολογικά και παθολογοανατομικά ευρήματα σε προβατίνα ομάδας Γ, στην οποία έγινε ευθανασία 4 ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό.



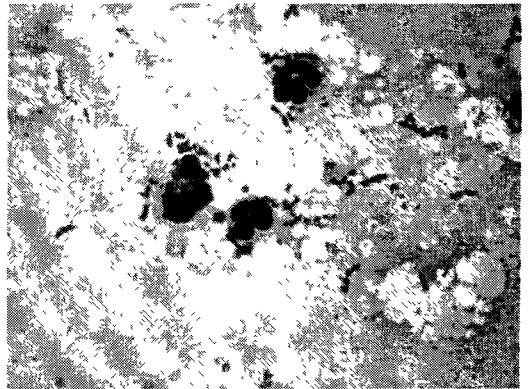
α. Διόγκωση μαστικού αδένος 12 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό και αλλοιώσεις τύπου charring στη θηλή.



β. Παρουσία βακίλων στο μαστικό έκκριμα 5 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό (X1000, χρώση Giemsa).

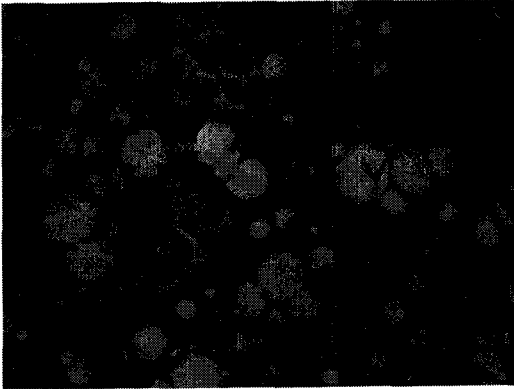


γ. Ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα που φαγοκυτταρώνουν βακίλους στο μαστικό έκκριμα 12 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό (X1000, χρώση Giemsa).



δ. Ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα που φαγοκυτταρώνουν βακίλους, καθώς και κατεστραμμένο ουδετερόφιλο λευκοκύτταρο στο μαστικό έκκριμα μία ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό (X1000, χρώση Giemsa).

Εικόνα V.3. Κλινικά, κυτταρολογικά και παθολογοανατομικά ευρήματα σε προβατίνα ομάδας Γ, στην οποία έγινε ευθανασία 4 ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό (συνέχεια).



ε. Κατεστραμμένα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα στο μαστικό έκκριμα 2 ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό (Χ1000, χρώση Giemsa).



στ. Πτυχώσεις, υπεραιμία και πάχυνση του βλεννογόνου του θηλαίου κόλπου.

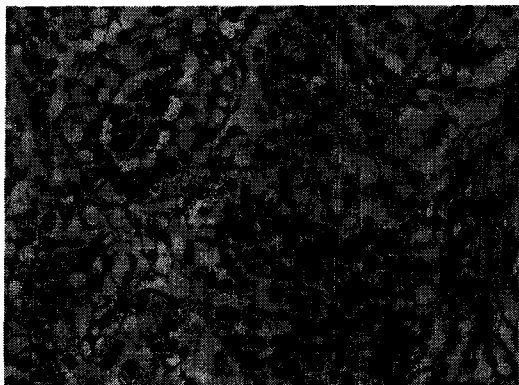


ζ. Διόγκωση μαστικών αδένων και εκτεταμένη αιμορραγία.



η. Συναθροίσεις λεμφοκυττάρων στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου (Χ100, χρώση H&E).

Εικόνα V.3. Κλινικά, κυτταρολογικά και παθολογοανατομικά ευρήματα σε προβατίνα ομάδας Γ, στην οποία έγινε ευθανασία 4 ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό (συνέχεια).



θ. Διήθηση από ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα, αιμορραγία και καταστροφή αδενοκυψελίδων στο μαστικό παρέγχυμα (Χ200, χρώση H&E).

Εικόνα V.4. Μακροσκοπικά νεκροτομικά ευρήματα σε προβατίνα ομάδας Γ, που στην οποία έγινε ευθανασία 3 ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό.



α. Συλλογή οροαιμορραγικού υγρού στην περικαρδιακή κοιλότητα.



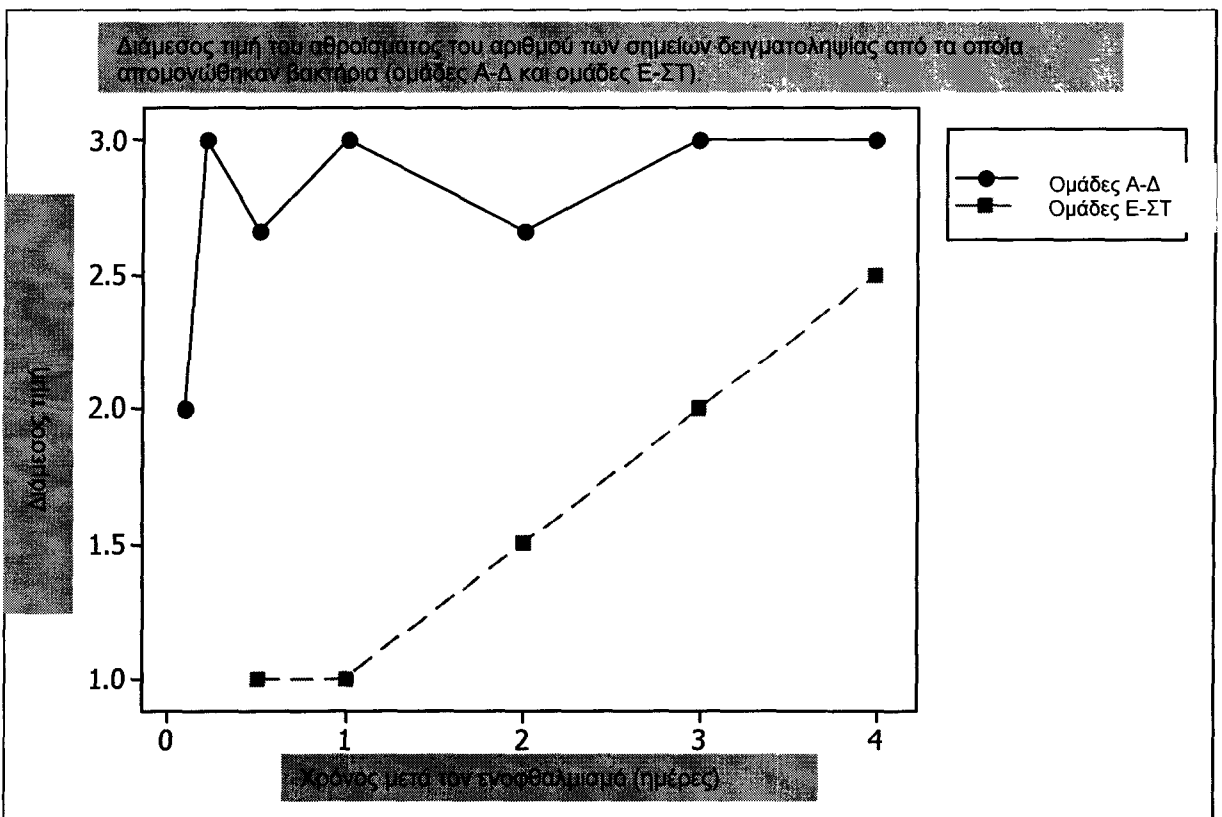
β. Πετέχειες στο μυοκάρδιο.

Εικόνα V.4. Μακροσκοπικά νεκροτομικά ευρήματα στην καρδιά προβατίνας ομάδας Γ, που στην οποία έγινε ευθανασία 3 ημέρες μετά τον ενδοφθαλμισμό (συνέχεια).



γ. Διόγκωση και εκτεταμένη αιμορραγία μαστικού παρεγχύματος.

Εικόνα V.5. Αποτελέσματα του αθροίσματος του αριθμού των σημείων δειγματοληψίας από τη θηλή και το μαστικό αδένα, από τα οποία απομονώθηκαν βακτήρια (διακύμανση αθροίσματος "0"- "3", διάμεσος τιμή για τις ομάδες Α, Β, Γ, Δ και για τις ομάδες Ε, ΣΤ).



ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Εισαγωγή

Η μαστίτιδα αποτελεί την πιο σημαντική ασθένεια του μαστικού αδένου και ένα από τα σημαντικότερα νοσήματα στις προβατοτροφικές εκμεταλλεύσεις γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης (Menzies & Ramapoon 2001). Στη μεγάλη πλειονότητα των περιπτώσεων η ασθένεια προκαλείται από Σταφυλοκόκκους ή από *Mannheimia haemolytica* (Bergonier & Berthelot 2003, Bergonier και συν. 2003).

Τρεις διαφορετικοί παράγοντες εμπλέκονται στο νόσημα: οι μικροοργανισμοί, το περιβάλλον και το ίδιο το ζώο. Η σημασία των μικροοργανισμών και του περιβάλλοντος στη μαστίτιδα έχει διαλευκανθεί. Αντίθετα, η επιστημονική βιβλιογραφία για τη σημασία του ζώου είναι σχετικά περιορισμένη.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, στις αγελάδες είναι τεκμηριωμένη η σημασία της θηλής ως σημαντικού φραγμού στην εισβολή των βακτηρίων στο μαστικό αδένου (Nickerson 1987, Norcross 1991). Η θηλή συμβάλλει σε τρεις διαφορετικούς φυσιολογικούς μηχανισμούς: ως "αισθητήριο" όργανο δεχόμενη ερεθίσματα που προκαλούν την έναρξη του αντανακλαστικού της καθόδου του γάλακτος, ως όργανο που συμβάλλει στην έξοδο του γάλακτος από το μαστικό αδένου και, τέλος, ως αμυντικός σχηματισμός για την προστασία του μαστικού αδένου (Hamann & Bunvenich 1994). Ο τριπλός αυτός ρόλος εκπληρώνεται με επιτυχία από τις υγιείς θηλές.

Καθώς υπάρχουν σημαντικές διαφορές στις μεθόδους εκτροφής μεταξύ αγελάδων και προβάτων, τα αποτελέσματα σχετικών μελετών στις αγελάδες δεν ισχύουν πάντα και στις προβατίνες. Στη βιβλιογραφία δεν υπάρχει ανάλογη τεκμηρίωση για τη σημασία της θηλής στις προβατίνες, ούτε για το ρόλο τον οποίο μπορούν να παίξουν οι διάφορες παθήσεις της.

Στην παρούσα διατριβή, περιγράφονται τα ευρήματα μιας εκτενούς έρευνας στη σημασία της θηλής στην προστασία του μαστικού αδένου των προβάτων, καθώς και στην παθογένεια της μαστίτιδας στις προβατίνες.

Περιγραφή και αξιολόγηση μίας νέας τεχνικής για λήψη υλικού από το θηλαίο πόρο προβάτων

Ένας σημαντικός παράγοντας, εξαιτίας του οποίου δεν υπήρχαν αρκετές πληροφορίες σχετικά με την οικολογία των βακτηρίων στις θηλές, ήταν η έλλειψη αξιόπιστης τεχνικής για τη δειγματοληψία υλικού από το θηλαίο πόρο σε ζωντανά ζώα. Καθώς η διάμετρος του στομίου

της θηλής είναι πολύ μικρή, δεν μπορεί να εισέλθει κάποιος βαμβακοφόρος στείλεός -ακόμη και ο πιο λεπτός- χωρίς να προκληθεί κάποια βλάβη.

Ο Fthenakis (1988) και ο Watkins (1990) προσπάθησαν να υπερκεράσουν αυτό το πρόβλημα χρησιμοποιώντας ένα συνδυασμό μεθόδων δειγματοληψίας. Έτσι, έλαβαν δείγματα ξεσμάτων από το βλεννογόνο του θηλαίου πόρου προβάτων μετά τη σφαγή τους. Επίσης, πραγματοποίησαν επαναλαμβανόμενες δειγματοληψίες από το δέρμα γύρω από το στόμιο της θηλής ζωντανών προβάτων, καθώς και δείγματα μαστικού εκκρίματος. Με αυτές τις μεθόδους, όμως, δεν ήταν δυνατή η μελέτη της βακτηριακής χλωρίδας στο θηλαίο πόρο ζωντανών ζώων, ούτε η διαπίστωση πιθανών διακυμάνσεων της κατά τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου.

Η μέθοδος που παρουσιάστηκε (Κεφάλαιο II, Τμήμα Β), βασίζεται στη χρήση λεπτού, στείρου πλαστικού καθετήρα. Με αυτήν μπορεί να γίνει δειγματοληψία υλικού από το θηλαίο πόρο ζωντανών προβάτων. Έτσι είναι εφικτή η συλλογή πληροφοριών σχετικά με την ταυτότητα και τις μεταβολές στο βακτηριακό πληθυσμό μέσα στο θηλαίο πόρο.

Οι λεπτοί, στείροι, πλαστικοί καθετήρες έχουν πολλά πλεονεκτήματα: εισέρχονται εύκολα μέσα στη θηλή, μπορούν να κοπούν σε οποιοδήποτε μήκος, είναι εύκολα διαθέσιμοι και έχουν σχετικά μικρό κόστος. Τα αποτελέσματα των μελετών που πραγματοποιήθηκαν (Κεφάλαιο II, Τμήμα Β) επιβεβαίωσαν την καταλληλότητά τους.

Στην πρώτη μελέτη μελετήθηκε η ακρίβεια της τεχνικής. Η νέα τεχνική αξιολογήθηκε έναντι της καθιερωμένης τεχνικής του Fthenakis (1988) και του Watkins (1990). Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν ότι η τεχνική δειγματοληψίας με τον καθετήρα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για να συλλεχθούν πληροφορίες, που αφορούσαν στην παρουσία και την ταυτότητα βακτηρίων μέσα στη θηλή.

Στη δεύτερη μελέτη επιβεβαιώθηκε η ασφάλεια αυτής της μεθόδου. Σε αυτήν, ένας πλαστικός καθετήρας εισαγόταν επανειλημμένα μέσα στο θηλαίο πόρο των προβάτων, προκειμένου να εξεταστεί το ενδεχόμενο εκδήλωσης μαστίτιδας στα ζώα. Η ασφάλεια της μεθόδου επιβεβαιώθηκε, δεδομένου ότι το ποσοστό προσβολής από μαστίτιδα στα ζώα ήταν μηδέν.

Στην τρίτη μελέτη εξετάστηκε η επαναληψιμότητα της μεθόδου. Σε ζεύγη δειγμάτων που είχαν ληφθεί σε σύντομα χρονικά διαστήματα βρέθηκαν απολύτως ίδια αποτελέσματα. Συνεπώς, η τεχνική μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να μελετηθεί η δυναμική της μόλυνσης στο θηλαίο πόρο και να εκτιμηθούν τα αποτελέσματα των διάφορων παραγόντων που δρουν στο ενδιαμέσο (π.χ. της άρμεξης ή των επεισοδίων θηλασμού) δύο δειγματοληψιών.

Συνεπώς, η τεχνική φαίνεται ότι είναι χρήσιμη σε ερευνητικές μελέτες. Για παράδειγμα, η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε σε κλινικές μελέτες (Κεφάλαιο II, Τμήμα Γ) για να μελετηθούν ο

πληθυσμός και η ταυτότητα των βακτηρίων στο θηλαίο πόρο προβάτων καθόλη τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου τους, καθώς και για να διαπιστωθεί η πιθανή επίδραση της άρμεξης στο βακτηριακό πληθυσμό. Επίσης, η τεχνική χρησιμοποιήθηκε στους πειραματισμούς (Κεφάλαιο III, Τμήμα Β & Κεφάλαιο V, Τμήμα Β) με σκοπό την παρακολούθηση της εισβολής και της ανόδου των βακτηρίων, μετά την πειραματική εναπόθεσή τους στο δέρμα της θηλής.

Ο ίδιος τύπος καθετήρων χρησιμοποιήθηκε επίσης για την πραγματοποίηση των ενοφθαλμισμών μέσα στη θηλή. Έτσι, έγινε δυνατή και η πειραματική μελέτη του ρόλου της θηλής.

Η τεχνική μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί σε ανάλογες μελέτες σε αγελάδες. Πάντως καθώς η διάμετρος των θηλών αυτών των ζώων είναι μεγαλύτερη, πιθανόν πρέπει να χρησιμοποιούνται καθετήρες 18 G.

Με βάση όλα τα παραπάνω, συμπεραίνεται ότι η μέθοδος παρέχει ακριβείς πληροφορίες όσον αφορά στη βακτηριακή χλωρίδα μέσα στο θηλαίο πόρο και είναι ασφαλής για τα ζώα. Εφόσον χρησιμοποιηθεί σωστά, μπορεί να παράσχει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την επιδημιολογία της μαστίτιδας.

Προστατευτικός ρόλος της θηλής

Σημασία των βακτηριολογικών ευρημάτων στο θηλαίο πόρο κλινικά υγιών προβάτων

Μετά την αξιολόγηση της παραπάνω τεχνικής, αυτή χρησιμοποιήθηκε για να γίνουν επαναλαμβανόμενες δειγματοληψίες από το θηλαίο πόρο προβάτων με κλινικά υγιείς θηλές και μαστικούς αδένες. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν καθόλη τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου των ζώων, δηλαδή και κατά το θηλασμό και κατά την άρμεξη. Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν η μελέτη της βακτηριακής χλωρίδας στη θηλή και το μαστικό αδένων των προβάτων και η διαπίστωση πιθανών μεταβολών της σε σχέση με διάφορους παράγοντες.

Σημαντικό εύρημα αποτελεί η αυξημένη πιθανότητα μόλυνσης του θηλαίου πόρου σε σχέση με το μαστικό έκκριμα των ίδιων ζώων. Το εύρημα αυτό αποτελεί την πρώτη ένδειξη ότι η θηλή, μέσω των αμυντικών μηχανισμών της, περιορίζει την εισβολή βακτηρίων προς το μαστικό αδένων και την πρόκληση μαστίτιδας.

Επιπλέον, σημαντικό εύρημα αποτελεί η παραμονή των βακτηρίων στο θηλαίο πόρο, χωρίς να εισβάλλουν στο μαστικό αδένων και χωρίς η δοκιμή CMT (ενδεικτική λευκοκυτταρικής

δίθησης) να είναι θετική. Έτσι, το στέλεχος VSM08L *M. haemolytica*, που απομονώθηκε σε επαναλαμβανόμενες δειγματοληψίες από το θηλαίο πόρο κλινικά υγιούς προβατίνας, δεν προκάλεσε κλινική ή υποκλινική μαστίτιδα στο ζώο αυτό, παραμένοντας μόνο στο θηλαίο πόρο.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, με βάση αυτά τα ευρήματα μπορεί να υποτεθεί ότι στο θηλαίο πόρο διατηρείται μία ισορροπία μεταξύ μικροοργανισμών και ζώου, η οποία εφόσον διαταραχθεί, μπορεί να καταλήξει σε μαστίτιδα. Η υπόθεση αυτή έγινε για πρώτη φορά από το Fthenakis (1988), χωρίς όμως να έχει ακολουθήσει πειραματική επιβεβαίωσή της. Με βάση τα παρόντα ευρήματα επιβεβαιώνεται η υπόθεση αυτή όσον αφορά στην ύπαρξη της ισορροπίας κατά τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου.

Απομόνωση βακτηρίων αμέσως μετά τον τοκετό

Η απομόνωση βακτηρίων από το μαστικό έκκριμα, αμέσως μετά τον τοκετό και πριν ακόμη θηλάσουν οι νεογέννητοι αμνοί, αποτελεί απόδειξη ότι τα βακτήρια αυτά είχαν εισβάλλει στο μαστικό αδένα είτε κατά την προηγούμενη γαλακτική περίοδο, είτε κατά την ξηρά περίοδο και παρέμειναν στο μαστικό αδένα. Στις προβατίνες έχει τεκμηριωθεί η μείωση της ανοσολογικής ικανότητας κατά την περιτοκιαία περίοδο (Walker 2000). Είναι λοιπόν, πιθανόν, η εκδήλωση μαστίτιδας αμέσως μετά τον τοκετό να μην οφείλεται μόνο σε νέες μολύνσεις, όπως γενικά πιστεύεται (Jones & Watkins 2001, Menzies & Ramanoon 2001), αλλά και σε στελέχη βακτηρίων, τα οποία βρίσκονται ήδη μέσα στο θηλαίο πόρο και το μαστικό παρέγχυμα. Λόγω της περιτοκιαίας μείωσης της ανοσολογικής ικανότητας του ζώου αναζωπυρώνεται η μόλυνση και εκδηλώνεται κλινική μαστίτιδα από τα βακτήρια.

Επιπλέον, τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν την ανάγκη μελέτης της μαστίτιδας της ξηράς περιόδου στις προβατίνες, αντικείμενο το οποίο δεν έχει μελετηθεί επαρκώς.

Διαφορές μεταξύ εκτροφών

Από τα αποτελέσματα φάνηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των εκτροφών στην πιθανότητα απομόνωσης βακτηρίων κατά την περίοδο του θηλασμού. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, στην εκτροφή Α κατά την περίοδο του θηλασμού τα ζώα σταυλίζονταν σε εντατικές συνθήκες. Όμως κατά την περίοδο της άρμεξης, όταν δηλαδή οι συνθήκες στις εκτροφές ήταν περίπου όμοιες, οι διαφορές αμβλύθηκαν και δεν ήταν σημαντικές.

Ο συνωστισμός ζώων σε μικρούς χώρους με αυξημένο μικροβιακό φορτίο συντελεί στην αύξηση της πιθανότητας μόλυνσης των ζώων (Albenzio και συν. 2002). Οι Sevi και συν. (2003) ανέφεραν συγκεκριμένα ότι σε εντατικές εκτροφές με διαθέσιμο χώρο μικρότερο από 7 m² ανά ζώο, υπήρχε αυξημένη συγκέντρωση μικροοργανισμών και αυξημένη πιθανότητα μόλυνσης του

μαστικού αδένων των ζώων. Επιπλέον, σε εντατικές εκτροφές τα ζώα καταπονούνται πιο εύκολα, λόγω των αυξημένων παραγωγικών απαιτήσεων: περισσότερες επεμβάσεις στον αναπαραγωγικό κύκλο, πιο συχνό τοκετό και μεγαλύτερη διάρκεια γαλακτικής περιόδου. Οι παράγοντες αυτοί καταπονούν την αμυντική ικανότητά τους και προδιαθέτουν στην είσοδο μικροβίων.

Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώνουν ότι οι ζωοτεχνικοί παράγοντες μπορεί να προδιαθέσουν τις προβατίνες σε είσοδο βακτηρίων στη θηλή και, συνακόλουθα, σε μαστίτιδα.

Ταυτότητα των μικροοργανισμών που απομονώθηκαν

Η πλειονότητα των βακτηρίων που απομονώθηκαν κατά τη διάρκεια αυτής της μελέτης ήταν πηκτάση-αρνητικοί Σταφυλόκοκκοι. Λιγότερο συχνά απομονώθηκαν *Bacillus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Arcanobacterium pyogenes* και *M. haemolytica*.

Οι πηκτάση-αρνητικοί Σταφυλόκοκκοι βρίσκονται στο δέρμα των ζώων, στα χέρια των αρμεκτών και στο περιβάλλον. Αν και παλαιότερα αυτά τα βακτήρια θεωρούνταν μη παθογόνα για το μαστικό αδένιο (Schalm και συν. 1971), ο ρόλος τους ως παθογόνων για το μαστικό αδένιο τεκμηριώθηκε σε μεταγενέστερες μελέτες (Fthenakis 1988, Burriel 1994).

Τα βακτήρια *Bacillus* spp. και *A. pyogenes* αποτελούν τμήμα της φυσιολογικής βακτηριακής χλωρίδας του δέρματος του μαστού (Fthenakis 1988), από όπου εισέρχονται στη θηλή.

Η πιο συχνή απομόνωση *M. haemolytica* κατά την περίοδο θηλασμού απ' ότι κατά την περίοδο άρμεξης είναι σύμφωνη με τα αποτελέσματα των Scott και Jones (1998). Το εύρημα αυτό αποτελεί περαιτέρω ένδειξη -όχι όμως απόδειξη- ότι ο μικροοργανισμός μεταφέρεται από τη στοματική κοιλότητα των αμνών στις θηλές των προβάτων.

Επίδραση της διαδικασίας άρμεξης

Στις αγελάδες έχει τεκμηριωθεί ότι η εσφαλμένη διαδικασία άρμεξης προδιαθέτει σε μαστίτιδα (International Dairy Federation 1987, Bramley 1992). Επίσης, έχει επιβεβαιωθεί ότι η είσοδος μικροοργανισμών στο μαστικό αδένιο λαμβάνει χώρα συνήθως μετά την άρμεξη (Pankey, Wildman, Dreschler & Hogan 1987). Το στόμιο της θηλής παραμένει ανοιχτό επί 30 min. μετά το τέλος του αρμέγματος (Williams & Mein 1987), διευκολύνοντας έτσι την είσοδο των βακτηρίων μέσα στη θηλή και κατ' επέκταση την εισβολή τους στο μαστικό αδένιο.

Όμως, καθώς επικρατούν διαφορετικές συνθήκες εκτροφής μεταξύ γαλακτοπαραγωγών αγελάδων και προβάτων (π.χ. οι αγελάδες αρμέγονται μηχανικά, ενώ οι προβατίνες με τα χέρια), δεδομένα που αφορούν σε αγελάδες δεν ισχύουν πάντα για τις προβατίνες. Σκοπός της

μελέτης αυτής ήταν η αξιολόγηση της πιθανής επίδρασης της διαδικασίας άρμεξης στη βακτηριακή χλωρίδα του θηλαίου πόρου και του μαστικού αδένων των προβάτων.

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης επιβεβαιώνουν ότι η διαδικασία της άρμεξης συντελεί στην αυξημένη μόλυνση του θηλαίου πόρου, όχι όμως και σε αυτήν του μαστικού αδένων των προβάτων.

Η αυξημένη μόλυνση του θηλαίου πόρου προφανώς οφείλεται στην είσοδο βακτηρίων μέσω του στομίου της θηλής κατά ή αμέσως μετά τη διαδικασία άρμεξης. Το γεγονός ότι η μεγάλη πλειονότητα των βακτηρίων που απομονώθηκε μετά τη διαδικασία άρμεξης, ήταν Σταφυλόκοκκοι (δηλαδή βακτήρια που υπάρχουν στο δέρμα της θηλής και στο δέρμα των χεριών των αρμεκτών) συνηγορεί υπέρ της παραπάνω υπόθεσης. Μάλιστα, στις αγελάδες έχει αναφερθεί η αυξημένη είσοδος Σταφυλοκόκκων στη θηλή έως και δύο ώρες μετά την άρμεξη (Hamann & Burvenich 1994).

Όμως, η αύξηση της συχνότητας μόλυνσης του θηλαίου πόρου δε συνοδεύεται από ανάλογη αύξηση στο μαστικό έκκριμα. Άλλωστε, κατά τη διάρκεια αυτής της μελέτης σε καμία προβατίνα δεν ανιχνεύθηκε μαστίτιδα. Τα ευρήματα υποστηρίζουν την άποψη ότι η υγιής θηλή προστατεύει αποτελεσματικά το μαστικό αδέν, αποτρέποντας την άνοδο βακτηρίων προς το θηλαίο κόλπο και το μαστικό παρέγχυμα.

Φαίνεται λοιπόν ότι οι αμυντικοί μηχανισμοί στη θηλή παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποτροπή της μόλυνσης του μαστικού αδέν. Επιπλέον, στις αγελάδες έχει παρατηρηθεί ότι οι συσπάσεις στην περιοχή του κάτω άκρου της θηλής αποτελούν σημαντικό παράγοντα, με τον οποίο αφενός αποτρέπεται η εισβολή των μικροοργανισμών στο μαστικό αδέν και αφετέρου συγκλείνει ο θηλαίος πόρος (Lefcourt 1982).

Σημασία των ιστοπαθολογικών ευρημάτων στις θηλές κλινικά υγιών προβάτων

Αν και στις αγελάδες υπάρχουν κάποιες δημοσιεύσεις σχετικές με την ιστολογία της θηλής, ανάλογες μελέτες δεν έχουν δημοσιευθεί για τις προβατίνες.

Όμοια στις προβατίνες δεν έχει βρεθεί περιοχή του θηλαίου πόρου που δρα ως σφιγκτήρας μυς. Επίσης, δεν έχει αναφερθεί η παρουσία του αποκαλούμενου "δακτυλίου του Furstenberg". Όμως, καθώς η θηλή αποτελεί τον ανατομικό σχηματισμό με τον οποίο ο μαστικός αδένας επικοινωνεί με το εξωτερικό περιβάλλον, η ύπαρξη αμυντικών μηχανισμών οι οποίοι να αποτρέπουν την εισβολή των βακτηρίων προς το μαστικό παρέγχυμα είναι απαραίτητη.

Από τα ευρήματα στο Κεφάλαιο II, Τμήμα Δ, φαίνεται ότι στη θηλή των προβάτων σημαντικός αμυντικός ρόλος ασκείται από τους κυτταρικούς μηχανισμούς. Συγκεκριμένα, η ανίχνευση ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων στο θηλαίο πόρο υποδεικνύει την ικανότητα των τοπικών ιστών, να προάγουν την απαιτούμενη πρώιμη τοπική αντίδραση μετά την είσοδο κάποιων βακτηρίων.

Οι Persson και συν. (1996) παρατήρησαν αυξημένο αριθμό λευκοκυττάρων στο μαστικό παρέγχυμα και στο θηλαίο κόλπο των προβάτων. Τα παρόντα ευρήματα έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματά τους, αποδεικνύοντας ότι στις προβατίνες η θηλή αποτελεί μία περιοχή σημαντικής κυτταρικής αμυντικής δραστηριότητας. Η παρουσία των λευκοκυττάρων αφενός αποτελεί ένα δείκτη της μεγάλης ικανότητας αντίδρασης του ιστού σε εισβάλλοντα μικρόβια και αφετέρου αποδεικνύει τη συνεχή έκθεση της περιοχής σε μικροοργανισμούς.

Σημαντικό εύρημα αποτελεί η παρατήρηση των συναθροίσεων λεμφοκυττάρων με μορφή χαρακτηριστική λεμφοζιδίου, στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου. Προφανώς τα μορφώματα αυτά αποτελούν στοιχείο των αμυντικών συστημάτων που αναπτύσσονται στη θηλή των προβάτων. Δεδομένου ότι αυτά παρατηρήθηκαν και στις θηλές των πειραματοζώων, η σημασία αυτού του λεμφικού ιστού θα συζητηθεί παρακάτω. Σημειώνεται ότι η παρουσία αυτού του σχηματισμού στη θηλή των προβάτων αναφέρεται για πρώτη φορά.

Η παρουσία των λεμφοκυττάρων μπορεί επίσης να είναι ενδεικτική προηγούμενης μόλυνσης του μαστού. Οι Fthenakis και συν. (1991) έχουν περιγράψει ότι μπορεί να παρατηρείται αυξημένος αριθμός σωματικών κυττάρων σε φυσιολογικό μαστικό έκκριμα για αρκετό διάστημα μετά από τη λήξη απομόνωσης των βακτηρίων από αυτό. Αυτό εξηγεί και την ανεύρεση λευκοκυττάρων σε θηλές, από τις οποίες δεν απομονώθηκαν βακτήρια.

Ενοφθαλμισμός *M. haemolytica* σε υγιείς θηλές

Σε προηγούμενες μελέτες στη μαστίτιδα των προβάτων τα βακτήρια τοποθετούνταν απευθείας στο γαλακτοφόρο κόλπο, παρακάμπτοντας με αυτόν τον τρόπο τη θηλή. Έτσι, η αρχική φάση της ασθένειας και, συνακόλουθα, ο ρόλος της θηλής των ζώων είχαν αγνοηθεί. Η προσέγγιση εκείνη ήταν η ενδεικνυόμενη, δεδομένου ότι, σύμφωνα με το Mimms (1987), σε πειραματισμούς στην παθογόνο δράση των μικροοργανισμών πρέπει στην αρχή να γίνεται απευθείας ενοφθαλμισμός τους στο όργανο-στόχο, ώστε να επιβεβαιωθεί η παθογόνος δράση τους, πριν πραγματοποιηθούν περαιτέρω μελέτες.

Στον πειραματισμό που περιγράφεται στο Κεφάλαιο III, Τμήμα Β, ο ενοφθαλμισμός δύο διαφορετικών στελεχών *M. haemolytica* έγινε μέσα ή γύρω από τις θηλές. Τα ευρήματα παρέχουν σημαντικά συμπεράσματα για τον προστατευτικό ρόλο της θηλής.

Οι προβατίνες των υποομάδων A1/B1 αποτέλεσαν τους θετικούς μάρτυρες στον πειραματισμό. Ο ενοφθαλμισμός τους έγινε απευθείας στο γαλακτοφόρο κόλπο του μαστικού αδένου με αποτέλεσμα την πρόκληση κλινικής μαστίτιδας. Όσον αφορά στο στέλεχος ES26L, με τον τρόπο αυτό επιβεβαιώθηκε η παθογόνος δράση του για το μαστικό αδένου (Ei-Masannat 1987, Ei-Masannat και συν. 1991). Όσον αφορά στο στέλεχος VSM08L, με τον τρόπο αυτό εξακριβώθηκε η παθογόνος δράση του για το μαστικό αδένου.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο II, Τμήμα Γ), το στέλεχος αυτό (VSM08L) είχε απομονωθεί από το θηλαίο πόρο μιας υγιούς προβατίνας (δοκιμή CMT στο μαστικό έκκριμα αρνητική, μη απομόνωση του μικροοργανισμού από το μαστικό έκκριμα). Όμως, το στέλεχος προκάλεσε κλινική μαστίτιδα, όταν ενοφθαλμίστηκε απευθείας στο γαλακτοφόρο κόλπο, δηλαδή όταν υπερκεράστηκαν οι αμυντικοί μηχανισμοί της θηλής. Σύμφωνα με όσα αναφέρθηκαν προηγουμένως, στην προβατίνα, από την οποία είχε αρχικά απομονωθεί αυτό το στέλεχος, υπήρχε ισορροπία μεταξύ των αμυντικών μηχανισμών του ξενιστή και του βακτηρίου. Αντίθετα, στα πειραματόζωα, όπου το βακτήριο ενοφθαλμίστηκε στο γαλακτοφόρο κόλπο, οι αμυντικοί μηχανισμοί παρακάμφθηκαν και αυτή η "ισορροπία" δεν υπήρχε, με αποτέλεσμα να προκληθεί μαστίτιδα.

Αυτό το εύρημα υποδεικνύει ότι η φυσιολογική, κλινικά υγιής θηλή του ζώου, από όπου απομονώθηκε το βακτήριο, παρείχε προστασία στο μαστικό αδένου. Επίσης, είναι πιθανόν τα βακτήρια, τα οποία συχνά υπάρχουν σε κλινικά υγιείς θηλές (Κεφάλαιο II, Τμήμα Γ), να αποτελέσουν πηγή μόλυνσης για το μαστικό αδένου. Κάποια πιθανή αλλαγή της ισορροπίας μεταξύ αμυντικών μηχανισμών ξενιστή (στη θηλή) και βακτηρίων μπορεί να επιτρέψει τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων, τα οποία εισβάλλοντας στο μαστικό αδένου θα προκαλέσουν μαστίτιδα.

Η συνεχής απομόνωση *M. haemolytica* από το δέρμα των θηλών, οι οποίες εμβαιπίστηκαν σε καλλιέργεια του μικροοργανισμού (υποομάδες A2/B2), υπογραμμίζει τη συνεχή δυνατότητα μόλυνσης του μαστικού αδένου των προβάτων. Έχει βρεθεί ότι το βακτήριο αποικιοποιεί το δέρμα της θηλής κατά την περίοδο του θηλασμού (Scott & Jones 1998). Οι αμνοί θηλάζουν τη μητέρα τους έως και 32 φορές καθημερινά (Bareham 1976), οπότε και η πιθανότητα εισβολής του βακτηρίου στη θηλή είναι συνεχής. Ο θηλασμός αυτός καθεαυτός μπορεί επίσης να συμβάλλει στην άνοδο των βακτηρίων, με την ώθηση των βακτηρίων προς το μαστικό αδένου.

Όμως και αντίθετα, μπορεί να υποτεθεί ότι ο θηλασμός αποτρέπει τη μόλυνση του μαστικού αδένου συμβάλλοντας στην απομάκρυνση των βακτηρίων, που έχουν εισβάλει. Προκειμένου να δημιουργηθούν στον πειραματισμό συνθήκες ανάλογες με τις φυσικές, οι προβατίνες αρμέγονταν τρεις φορές την ημέρα, ώστε να κενωθούν οι μαστικοί αδένες τους. Όμως, τα βακτήρια εισέβαλλαν τελικά στο μαστικό παρέγχυμα, όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα των βακτηριολογικών και κυτταρολογικών εξετάσεων.

Με τα ευρήματα του πειραματισμού αυτού μπορεί να γίνουν υποθέσεις σχετικά με το αρχικό στάδιο της ασθένειας. Κατά τη διάρκεια του θηλασμού, βακτήρια από τη στοματική κοιλότητα των αμνών προσκολλώνται στο δέρμα της θηλής μέσω των ινιδίων τους (Morck και συν. 1989). Η προσκόλληση του βακτηρίου αποτελεί σημαντικό λοιμογόνο παράγοντα στην παθογένεια της μαστίτιδας (Vilela και συν. 2004). Άλλωστε κατά τη διάρκεια του θηλασμού, καθώς η θηλή της προβατίνας εισέρχεται στη στοματική κοιλότητα του αμνού, το στόμιό της έρχεται συχνά σε επαφή με την είσοδο του φάρυγγα.

Το γεγονός ότι η μαστίτιδα παρατηρείται πιο συχνά σε προβατίνες που θηλάζουν δίδυμους αμνούς (Sevi, Taibi, Muscio, Dell'Aquila & Casamassima 1998, Caroprese, Sevi, Schena, Annichiarico & Muscio 2005) μπορεί ακριβώς να οφείλεται στην αυξημένη συχνότητα μόλυνσης των θηλών τους, λόγω της συχνότερης επαφής με το μικρόβιο.

Στη συνέχεια, τα βακτήρια εισέρχονται στο θηλαίο πόρο. Σε κλινικά υγιείς θηλές, για την είσοδό τους απαιτείται χρονικό διάστημα έως 5 ημερών (Κεφάλαιο III, Τμήμα Β). Αυτή η χρονική διαφορά θα μπορούσε να εξηγήσει την απομόνωση *M. haemolytica* από περιστατικά κλινικής μαστίτιδας σε αρμεγόμενες προβατίνες, αμέσως μετά τον απογαλακτισμό των αμνών τους (Φθενάκης & Jones 1990). Έτσι θα μπορούσε επίσης να ερμηνευτεί η απομόνωση του μικροοργανισμού στην εκτροφή Α κατά την περίοδο της άρμεξης.

Ο El-Masannat (1987) ανέφερε την πρόκληση κλινικής μαστίτιδας μετά από ενοφθαλμισμό απευθείας στο γαλακτοφόρο κόλπο πολύ μικρού αριθμού (μόνον 7 c.f.u.) του στελέχους ES26L. Στον παρόντα πειραματισμό μόνο δύο προβατίνες, στις οποίες το βακτήριο τοποθετήθηκε σε απόσταση 6 mm από το στόμιο της θηλής τους (υποομάδες A4/B4), εκδήλωσαν κλινική μαστίτιδα. Οι άλλες προβατίνες των υποομάδων A4/B4 και οι προβατίνες των υποομάδων A3/B3 δεν εκδήλωσαν κλινική μαστίτιδα, αν και ενοφθαλμίστηκαν με αριθμό βακτηρίων 174 φορές μεγαλύτερο.

Ο El-Masannat (1987) απέδειξε ότι για την πειραματική πρόκληση κλινικής μαστίτιδας ήταν απαραίτητη η χρήση καλλιέργειας *M. haemolytica*, διάρκειας επώασης 5 ωρών, δηλαδή στη λογαριθμική φάση ανάπτυξής τους (διάρκεια επώασης: 5 ώρες). Τότε είναι αναπτυγμένη η βακτηριακή κάψα. Οι Gatewood και συν. (1994) ανέφεραν ότι η κάψα αποτελούσε σημαντικό

λοιμογόνο παράγοντα του βακτηρίου, δεδομένου ότι παρείχε προστασία στο μικροοργανισμό από τα φαγοκύτταρα. Στον παρόντα πειραματισμό, χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες βακτηρίων μετά από επώαση 5 ωρών, αλλά και πάλι δεν έγινε δυνατή η πρόκληση κλινικής μαστίτιδας μετά την εναπόθεση των βακτηρίων στο θηλαίο πόρο. Πιθανόν, η ύπαρξη ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων και πλασμοκυττάρων (όπως φάνηκε από τα αποτελέσματα του πειραματισμού) είχε ως αποτέλεσμα την αυξημένη φαγοκυττάρωση των ενοφθαλμισθέντων βακτηρίων, ακόμη και σε καλλιέργειες 5 ωρών. Τα ευρήματα αυτά ενισχύουν περαιτέρω την άποψη για τον προστατευτικό ρόλο της θηλής.

Πέραν των κυτταρικών και χυμικών αμυντικών μηχανισμών που υπάρχουν στη θηλή, πιθανόν και η βακτηριακή χλωρίδα του θηλαίου πόρου δρα ανταγωνιστικά προς τα εισβάλλοντα βακτήρια, καθυστερώντας έτσι την ανάπτυξή τους και ταυτόχρονα καθιστώντας τα πιο ευπαθή στους αμυντικούς μηχανισμούς της θηλής και του μαστικού αδένα. Μάλιστα, οι Linde, Holmberg και Astrom (1980) βρήκαν ότι σε περιπτώσεις ύπαρξης ηηκτάση-αρνητικών Σταφυλοκόκκων στο μαστικό παρέγχυμα αγελάδων ήταν σπάνια η εκδήλωση μαστίτιδας, ακόμη και μετά τον ενδομαστικό ενοφθαλμισμό μικροοργανισμών. Στον παρόντα πειραματισμό χρησιμοποιήθηκαν πειραματόζωα χωρίς βακτήρια στο θηλαίο πόρο τους. Όμως, καθώς βρέθηκε ότι αυτά τα βακτήρια αποτελούσαν την πλειονότητα της βακτηριακής χλωρίδας στο θηλαίο πόρο των προβάτων (Κεφάλαιο II, Τμήμα Γ), μπορεί κάποιος να υποθέσει ότι γενικά συμμετέχουν στους προστατευτικούς μηχανισμούς της θηλής.

Τα ενοφθαλμισμένα στη θηλή βακτήρια, αν και έφθασαν στο μαστικό παρέγχυμα (όπως αποδεικνύεται από την απομόνωσή τους από τα δείγματα μαστικού εκκρίματος και μαστικού ιστού), δεν προκάλεσαν κλινική μαστίτιδα. Μία πιθανή εξήγηση είναι ότι τα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα, τα οποία φτάνουν στη θηλή σχεδόν άμεσα (εντός 30 min. έως δύο ωρών) μετά τον ενοφθαλμισμό (Colditz & Persson 1988), "προετοίμασαν" κατά κάποιον τρόπο το μαστικό αδένα, για να αμυνθεί ενάντια στα εισβάλλοντα βακτήρια. Όταν όμως ο ενοφθαλμισμός γινόταν απευθείας στο γαλακτοφόρο κόλπο, η διήθηση των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων ήταν πιο αργή, παρατηρούνταν δε δύο έως τέσσερις ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό βακτηριακών τοξινών (Paape, Scultze, Desjardins & Miller 1974, Saad & Ostensson 1990) ή 12 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό βακτηρίων (El-Masannat 1987, Fthenakis & Jones 1990β). Τότε τα βακτήρια είχαν πλέον πολλαπλασιαστεί σε ικανό αριθμό, ώστε δεν μπορούσαν να αντιμετωπιστούν από τα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα.

Προφανώς κάποιος αριθμός βακτηρίων φαγοκυτταρώνεται στο θηλαίο πόρο και το θηλαίο κόλπο. Έτσι, τελικά στο μαστικό παρέγχυμα φθάνει μικρότερος αριθμός βακτηρίων, κάνοντας την αντιμετώπισή τους από τους αμυντικούς μηχανισμούς ακόμη πιο εύκολη.

Σε μία προηγούμενη μελέτη (Μανγογιάννη και συν. 2004), περιγράφηκε ότι ένα παθογόνο στέλεχος *S. chromogenes* προκάλεσε ήπια, παροδική κλινική μαστίτιδα τέσσερις ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό του στο θηλαίο πόρο προβάτων. Όταν το ίδιο ακριβώς στέλεχος είχε ενοφθαλμιστεί απευθείας στο γαλακτοφόρο κόλπο προβάτων, προκάλεσε έντονη κλινική μαστίτιδα 24 ώρες από τον ενοφθαλμισμό του (Fthenakis & Jones 1990α). Επιπλέον, οι Franz και συν. (2003) ανέφεραν ότι η μαστίτιδα ήταν σπάνια σε προβατίνες με μακρύ θηλαίο πόρο, για τη διάβαση του οποίου απαιτείται προφανώς μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Έτσι, τα βακτήρια είναι εκτεθειμένα στους αμυντικούς μηχανισμούς για μακρότερο χρονικό διάστημα. Αυτές οι μελέτες συμβάλλουν περαιτέρω στην ενίσχυση της υπόθεσης ότι η θηλή παίζει σημαντικό προστατευτικό ρόλο για το μαστικό αδένια των προβάτων.

Επιπλέον, είναι αξιοσημείωτο ότι στα πειραματόζωα, τα οποία ενοφθαλμίστηκαν σε απόσταση 2 mm από το στόμιο της θηλής ή στα οποία έγινε εμβάπτιση της θηλής σε καλλιέργεια μικροβίων, παρατηρήθηκαν συναθροίσεις ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων και βλαστική δραστηριότητα στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου. Ο σχηματισμός ήταν υπερπλαστικός και περιείχε μεγάλο αριθμό πλασμοκυττάρων. Οι Collins, Parsons και Bland (1986) παρουσίασαν σε θηλές αγελάδων έναν παρόμοιο σχηματισμό. Η ανεύρεση λεμφικού ιστού με ενεργοποιημένα λευκοκύτταρα και βλαστική δραστηριότητα στη θηλή αποδεικνύει τη σημασία του στην προστασία του μαστικού αδένια κατά την αρχική φάση της εισβολής των βακτηρίων. Επιπλέον, η ανεύρεση πλασμοκυττάρων αποτελεί έμμεση απόδειξη του ρόλου των ανοσοσφαιρινών στις μολύνσεις του μαστικού αδένια.

Σημειώνεται ότι στα ζώα των υποομάδων A1/B1 και A4/B4, δεν παρατηρήθηκε αυτό το μόρφωμα στη θηλή. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι σε αυτά τα ζώα, το ενοφθαλμισμό τοποθετήθηκε μετά το θηλαίο πόρο (στο γαλακτοφόρο κόλπο ή στο θηλαίο κόλπο, αντίστοιχα), οπότε δεν υπήρχε το αντιγονικό ερέθισμα στο θηλαίο πόρο για δραστηριοποίηση του ιστού.

Επίδραση των παθήσεων της θηλής στον προστατευτικό ρόλο της

Κλινικά περιστατικά παθήσεων των θηλών

Στο Κεφάλαιο IV περιγράφηκαν με λεπτομέρεια τα ευρήματα παθολογικών καταστάσεων σε θηλές προβάτων. Τα κλινικά, κυτταρολογικά, βακτηριολογικά, μακροσκοπικά νεκροτομικά και ιστοπαθολογικά ευρήματα έδειξαν μία ποικιλία αλλοιώσεων στις θηλές των προβάτων,

χαρακτηριστικών όσων συναντώνται στις προβατοτροφικές εκμεταλλεύσεις. Σημειώνεται ότι η μελέτη αυτή δεν ήταν επιδημιολογική, καθώς αυτό ήταν εκτός των σκοπών της παρούσας διατριβής. Συνεπώς, δε συλλέχθηκαν στοιχεία σχετικά με τη συχνότητα των διαφόρων παθήσεων που παρουσιάζονται. Η μελέτη αποσκοπούσε στην εξέταση κλινικών περιστατικών στις θηλες και στην παρουσίαση των ευρημάτων.

Παρατηρήθηκε ότι από ζώα με αλλοιώσεις, απομονώθηκαν συχνά βακτήρια από το υλικό από το θηλαίο πόρο (9/18), αλλά πιο σπάνια από το μαστικό έκκριμα (6/18) ή το σύστοιχο μαστικό παρέγχυμα (2/12).

Στις ιστολογικές τομές των θηλών από τα ζώα αυτά παρατηρήθηκαν λευκοκύτταρα, χαρακτηριστικά της φλεγμονώδους αντίδρασης, η οποία ορισμένες φορές ήταν αποτελεσματική, ώστε δεν εισέβαλλαν βακτήρια στο μαστικό παρέγχυμα. Στις ιστολογικές τομές αρκετών μαστικών αδένων παρατηρήθηκε λευκοκυτταρική διήθηση στο μαστικό παρέγχυμα και καταστροφή των δομικών στοιχείων (9/12 και 8/12, αντίστοιχα). Αυτές οι αλλοιώσεις μπορεί να έχουν δημιουργηθεί από προηγούμενη μόλυνση του μαστικού αδένου (δεδομένου ότι τα ζώα ήταν μεγάλης ηλικίας), αλλά μπορεί να είναι και αποτέλεσμα εισόδου του ίδιου βακτηρίου που απομονώθηκε από υλικό από το θηλαίο πόρο. Συγκεκριμένα, στα κλινικά περιστατικά Αρ. 2 και Αρ. 5 απομονώθηκε το ίδιο βακτήριο (*S. simulans* και *M. haemolytica*, αντίστοιχα) από το θηλαίο πόρο, το μαστικό έκκριμα και το παρέγχυμα, υποδηλώνοντας ότι το βακτήριο που υπήρχε στην αντίστοιχη θηλή, είχε εισβάλει και στο μαστικό παρέγχυμα. Αυτό πιθανόν οφείλεται στη μειωμένη άμυνα της θηλής λόγω των αλλοιώσεών της, με αποτέλεσμα να έχει προκληθεί υποκλινική μαστίτιδα.

Στα κλινικά περιστατικά Αρ. 5, 6 και 7, όπου βρέθηκαν αλλοιώσεις πιθανόν προερχόμενες από δαγκώματα από αμνούς, απομονώθηκε *M. haemolytica* από το υλικό από το θηλαίο πόρο. Σε περιπτώσεις τραυματισμών στη θηλή, αφενός πιθανόν μειώνεται η αμυντική ικανότητά της και αφετέρου λόγω των εκδορών αυξάνεται η συνολική επιφάνεια του δέρματος της θηλής (Sieber & Farnsworth 1984). Αυτά συντελούν στην πιο εύκολη προσκόλληση των βακτηρίων στο δέρμα και την αύξηση του βακτηριακού φόρτου κοντά στο στόμιο της θηλής. Μάλιστα, στο κλινικό περιστατικό Αρ. 5, *M. haemolytica* απομονώθηκε και από το πυώδες υλικό του αποστήματος στη θηλή. Παράλληλα η δοκιμή CMT ήταν θετική, οπότε η υποκλινική μαστίτιδα πιθανόν είχε προκληθεί από το βακτήριο το οποίο εισέβαλλε στο μαστικό αδένου.

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι οι υπερμεγέθεις θηλές προδιαθέτουν σε μαστίτιδα (Menzies & Ramanoon 2001). Στο κλινικό περιστατικό Αρ. 1 βρέθηκε υποκλινική μαστίτιδα και απομονώθηκαν μικροοργανισμοί από το μαστικό έκκριμα και των δύο αδένων. Αυτό πιθανόν οφείλεται στο γεγονός ότι οι υπερμεγέθεις θηλές αρμέγονται δύσκολα, οπότε παραμένει γάλα

(Menzies & Ramanoon 2001), το οποίο αποτελεί καλό υπόστρωμα για την ανάπτυξη των εισβαλλόντων μικροοργανισμών.

Η στένωση των θηλών συνήθως αποτελεί κατάληξη τραυματισμού της, με αποτέλεσμα η άρμεξη των ζώων να γίνεται με δυσκολία. Στο κλινικό περιστατικό Αρ. 9 παρατηρήθηκε χαρακτηριστική πάχυνση του τοιχώματος της θηλής, σύμπτωμα το οποίο περιγράφηκε και μετά από πειραματική αναπαραγωγή στένωσης της θηλής (Manvroggianni και συν. 2004).

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι η σταφυλοκοκκική δερματίτιδα του δέρματος του μαστού και της θηλής προδιαθέτει τα ζώα σε μαστίτιδα. Πράγματι, στο κλινικό περιστατικό Αρ. 3 παρατηρήθηκε αμφοτερόπλευρη μαστίτιδα. Δεδομένου ότι τα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα καταστρέφονται στην υψηλή θερμοκρασία που αναπτύσσεται στους φλεγμαίνοντες ιστούς (Harlan, Schwartz, Reidy, Schwartz, Ochs & Harker 1985) και ότι εξαιτίας της δερματίτιδας υπάρχει φλεγμονή στην περιοχή του μαστικού παρεγχύματος, η αμυντική ικανότητα του μαστικού αδένου πιθανόν περιορίζεται, σε συνδυασμό δε με τον αυξημένο αριθμό βακτηρίων στο δέρμα του μαστού και των θηλών αναπτύσσεται η προδιάθεση του ζώου σε μαστίτιδα.

Τέλος, σημειώνεται ότι μόνο σε μία θηλή με ιστοπαθολογικά ευρήματα παρατηρήθηκαν οι χαρακτηριστικές συναθροίσεις λευκοκυττάρων με μορφή λεμφοζιδίων στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου. Η απουσία αυτού του σχηματισμού από τις άλλες θηλές πιθανόν αποτελεί συνέπεια των αλλοιώσεών τους, μπορεί δε να έχει συντελέσει στην αυξημένη προσβολή του μαστικού αδένου από τους μικροοργανισμούς. Αυτό συνηγορεί υπέρ της υπόθεσης σχετικά με τον αμυντικό ρόλο του μορφώματος αυτού.

Ενοφθαλμισμός *M. haemolytica* σε θηλές με αλλοιώσεις

Στον πειραματισμό που περιγράφηκε στο Κεφάλαιο III, Τμήμα Β, αποδείχθηκε ο ρόλος της υγιούς θηλής στην άμυνα του μαστικού αδένου, μετά από ενοφθαλμισμό με δύο διαφορετικά στελέχη *M. haemolytica*. Το ένα από τα δύο στελέχη χρησιμοποιήθηκε και για τον ενοφθαλμισμό μη υγιών θηλών. Το στέλεχος είχε απομονωθεί από υλικό από το θηλαίο πόρο υγιούς προβατίνας (Κεφάλαιο II, Τμήμα Γ).

Σκοπός των δύο πειραματισμών που περιγράφονται στο Κεφάλαιο V, Τμήμα Β, ήταν η διερεύνηση του πιθανού προστατευτικού ρόλου της θηλής σε περιστατικά με φυσικές ή τεχνητά προκληθείσες αλλοιώσεις. Όμως, προβατίνες είτε με αλλοιώσεις στις θηλές τους από λοιμώδες έκθυμα ή θηλωμάτωση, είτε με τεχνητά προκληθείσες αλλοιώσεις τύπου "chapping", εκδήλωσαν κλινική μαστίτιδα σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα μετά τον ενοφθαλμισμό. Τα ζώα αυτά

ενοφθαλμίστηκαν με δόση ίδια με αυτήν που τοποθετήθηκε στο θηλαίο πόρο προβάτων με κλινικά υγιείς θηλές (Κεφάλαιο III, Τμήμα Β).

Το λοιμώδες έκθυμα και η θηλωμάτωση αποτελούν δύο συχνές ιογενείς ασθένειες των προβάτων (Watt 1983, Uzal, Latorraca, Ghodduzi, Horn, Adamson, Kelly & Schenkel 2000, Yeruham, Perl & Abraham 2000, Buttner & Rziha 2002). Κλινικά περιστατικά αυτών των δύο παθήσεων των θηλών περιγράφηκαν στο Κεφάλαιο IV, Τμήμα Β. Οι αλλοιώσεις τύπου "chapping" μπορεί να παρατηρηθούν ως συνέπεια κακής αρμεκτικής τεχνικής (Bramley 1992, Hemling 2002) ή έκθεσης των ζώων σε κρύο (Burmeister, Fox, Hancock, Gay, Gay, Parish & Tyler 1995, Fox & Hancock 1989) ή σε ρεύματα αέρα (Fox & Norell 1994). Επίσης, είναι πιθανόν να δημιουργούνται αρχικά κατά τη διαδικασία άρμεξης, επιβαρυνόμενες στη συνέχεια από περιβαλλοντικούς παράγοντες (Francis 1984).

Στις αγελάδες έχει αποδειχθεί η συσχέτιση μεταξύ παθήσεων των θηλών και μαστίτιδας (Saloniemi & Roine 1981, Witzig και συν. 1984, Neijenhuis και συν. 2001). Όμως, όπως ήδη αναφέρθηκε, στις προβατίνες η ανάλογη βιβλιογραφία δεν είναι σαφής. Κάποιοι συγγραφείς αναφέρουν συσχέτιση παθήσεων των θηλών και μαστίτιδας (Doherty & Bassett 1989, Gunning & Bosworth 1989, Quinney και συν. 1996, Onash και συν. 2003). Αντίθετα, άλλοι συγγραφείς (Al-Majali & Jawabreh 2003, Watkins και συν. 1991) δεν βρήκαν συσχέτιση μεταξύ μαστίτιδας και παθήσεων των θηλών. Σημειώνεται ότι οι παρόντες πειραματισμοί αποτελούν τα πρώτα ερευνητικά δεδομένα γι' αυτήν την υπόθεση.

Τα αποτελέσματα των δύο αυτών πειραματισμών αποδεικνύουν σαφώς ότι θηλές με αλλοιώσεις δεν προστατεύουν επαρκώς το μαστικό αδέν. Προηγουμένως αναφέρθηκε ότι στην προβατίνα από την οποία είχε αρχικά απομονωθεί το στέλεχος VSM08L, υπήρχε ισορροπία μεταξύ των αμυντικών μηχανισμών του ξενιστή και του βακτηρίου. Αναφέρθηκε επίσης ότι στα πειραματόζωα όπου το βακτήριο ενοφθαλμίστηκε στο γαλακτοφόρο κόλπο, οι αμυντικοί μηχανισμοί παρακάμφθηκαν και αυτή η "ισορροπία" δεν υπήρχε. Έτσι προκλήθηκε μαστίτιδα. Ακριβώς διαταραχή της "ισορροπίας" προκαλούν και οι παθήσεις των θηλών, προδιαθέτοντας τα ζώα σε μαστίτιδα. Διάφοροι μηχανισμοί και οδοί ίσως επηρεάζουν αρνητικά τους αμυντικούς μηχανισμούς των ζώων ή αυξάνουν τη λοιμογόνο δράση των εισβαλλόντων μικροοργανισμών.

Ο ιός του λοιμώδους εκθύματος περιλαμβάνει γονίδια που επηρεάζουν την αντιική ανοσία και τους μηχανισμούς της ανοσολογικής ανταπόκρισης του ζώου-ξενιστή. Συγκεκριμένα, ο ιός παράγει ιντερλευκίνη-10, η οποία καταστέλλει την παραγωγή κυτοκινών από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα του ξενιστή. Παράγει επίσης τον αναστολέα του παράγοντα GM-CSF, ο οποίος είναι μία πρωτεΐνη που αναστέλλει τη βιολογική δραστηριότητα του παράγοντα GM-CSF και της ιντερλευκίνης-2 (Haig, Thomson, McInnes, McCaughan, Imlach, Mercer &

Fleming 2002). Στο μαστικό αδένα ο παράγοντας GM-CSF ενεργοποιεί τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα (Haig, Percival, Mitchell, Green & Sargan 1995), προάγει τη χημειοτακτική ικανότητα και την παραγωγή υπεροξειδάσης από τα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα (Daley, Williams, Dougherty, Coyle, Furda & Hayes 1993). Η ιντερλευκίνη-2 ενισχύει την ικανότητα φαγοκυττάρωσης των μακροφάγων και συμμετέχει στην αρχική ανοσολογική ανταπόκριση στο μαστικό αδένα (Daley και συν. 1993, Sordillo, Weaver & DeRosa 1997). Οι δύο αυτοί παράγοντες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στους αμυντικούς μηχανισμούς του μαστικού αδένα.

Οι Haig και συν. (2002) ανέφεραν επίσης ότι σε ιστούς με αλλοιώσεις λοιμώδους εκθύματος, δεν βρίσκονταν μακροφάγα. Στην παρούσα μελέτη πράγματι δεν παρατηρήθηκαν μακροφάγα στα επιχρίσματα μαστικού εκκρίματος από προβατίνες με λοιμώδες έκθυμα ή θηλωμάτωση. Τα μακροφάγα αποτελούν τον πρώτο κυτταρικό αμυντικό μηχανισμό του μαστικού αδένα (Craven 1986), οπότε η απουσία τους πολύ πιθανόν συντέλεσε στην ταχεία εισβολή των βακτηρίων προς το μαστικό αδένα, με αποτέλεσμα την εκδήλωση κλινικής μαστίτιδας.

Ο ιός της θηλωμάτωσης επηρεάζει επίσης, με διάφορους μηχανισμούς, την άμυνα του ξενιστή (O'Brien & Campo 2002). Μεταξύ άλλων μειώνει την ανοσολογική ανταπόκρισή του, επηρεάζοντας αρνητικά την "παρουσίαση" του αντιγόνων στα λεμφοκύτταρα, αναστέλλοντας τη δραστηριότητα των ιντερλευκινών και επιδρώντας αρνητικά στη δραστηριότητα του συστήματος MHC στους προσβεβλημένους ιστούς. Τα προσβεβλημένα ζώα μπορεί να εμφανίσουν ανοσοκαταστολή (Mill & Campbell 1992, Bredal, Thoresen, Rimstad, Aleksandersen & Nafstad 1996). Στις αγελάδες, ο ιός μπορεί να επιδράσει αρνητικά στους αμυντικούς μηχανισμούς του μαστικού αδένα (Francis 1984, Yirrell, Norval & Reid 1994) επιτρέποντας έτσι στις βακτηριακές μολύνσεις να προκαλέσουν μαστίτιδα (William, Kirubaharan, Uthuman, Kumanan & Balachandran 1992), μειώνοντας ειδικά τον αριθμό των κυττάρων-παρουσιαστών των αντιγόνων (Tay, Jenkins, Maddox, Champion & Singer 1987). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αυτής δείχνουν πως οι ίδιες συνθήκες πιθανόν ισχύουν και στις προβατίνες.

Στις προβατίνες με αλλοιώσεις λοιμώδους εκθύματος ή θηλωμάτωσης δεν βρέθηκαν οι χαρακτηριστικές συναθροίσεις λεμφοκυττάρων με εικόνα χαρακτηριστική λεμφοζιδίου στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου. Συνεπώς, η απουσία αυτού του αμυντικού σχηματισμού πιθανόν συνέβαλλε αποφασιστικά στη μειωμένη αμυντική ικανότητα της θηλής και στη γρήγορη εκδήλωση κλινικής μαστίτιδας. Αυτά τα ευρήματα επιβεβαιώνουν ότι οι ιογενείς αλλοιώσεις στις θηλές προδιαθέτουν τις προβατίνες σε μολύνσεις του μαστικού αδένα.

Υπό ορισμένες συνθήκες, μπορεί επιπλέον να ενισχύεται η λοιμογόνος δράση των μικροοργανισμών. Η Burriel (1997) ανέφερε ότι υπήρχε αυξημένη συγκέντρωση σιδήρου στο γάλα προβάτων με λοιμώδες έκθυμα. Η παρουσία σιδήρου στους ιστούς βρέθηκε ότι αύξανε την ευπάθεια των ζώων σε μόλυνση από *M. haemolytica* (Al-Sultan & Aitken 1984), λόγω της αυξημένης παραγωγής λευκοτοξίνης από το βακτήριο (Gentry, Confer, Weinberg & Homer 1986). Πιθανόν λοιπόν η αυξημένη συγκέντρωση σιδήρου στο γάλα των προβάτων με λοιμώδες έκθυμα συνέβαλε στο γρήγορο πολλαπλασιασμό των ενοφθαλισμένων βακτηρίων και στην αυξημένη παραγωγή λευκοτοξίνης, οπότε -σε συνέργεια με την υπάρχουσα ανοσοκαταστολή στον ξενιστή- είχε ως αποτέλεσμα την εκδήλωση κλινικής μαστίτιδας με έντονα συμπτώματα σε σύντομο χρονικό διάστημα μετά τον ενοφθαλισμό.

Η αποτελεσματικότητα των αμυντικών μηχανισμών της θηλής εξαρτάται άμεσα από την ακεραιότητα των ιστών της. Μάλιστα, πιστεύεται ότι οποιαδήποτε βλάβη των ιστών της θηλής προδιαθέτει σε αυξημένη πιθανότητα ενδομαστικής μόλυνσης (Hamann 1985, 1989). Έτσι, έχει αναφερθεί σε αγελάδες ότι όταν το δέρμα των θηλών δεν ήταν υγιές, υπήρχε αυξημένο ποσοστό μαστίτιδας (Hamann 1992). Οποιαδήποτε βλάβες στην κατάσταση του δέρματος της θηλής θεωρείται ότι έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη προσκόλληση παθογόνων βακτηρίων στην επιφάνεια της θηλής και, τελικά, αυξημένη συχνότητα ενδομαστικών μολύνσεων (Pankey, Eberhart, Cumming, Daggett, Farnsworth & McDuff 1984).

Στις αγελάδες θεωρείται ότι θηλές με σκασίματα του δέρματος (αλλοιώσεις τύπου "charring") συντελούν σε αυξημένη πιθανότητα ενδομαστικής μόλυνσης (Neijenhuis και συν. 2001). Σε περιπτώσεις κακών καιρικών συνθηκών με έντονο κρύο έχει παρατηρηθεί μεγάλη συχνότητα εμφάνισης θηλών με σκασίματα (Fox & Hancock 1989), γεγονός το οποίο συσχετίστηκε περαιτέρω με αυξημένη συχνότητα μολύνσεων του μαστικού αδένου από *S. aureus* (Fox & Hancock 1989). Πιστεύεται ότι η κακή κατάσταση του δέρματος της θηλής επιτρέπει την αυξημένη αποικιοποίησή του από τα βακτήρια, σε σχέση με το υγιές δέρμα (Pankey και συν. 1984, Fox και συν. 1991). Στις προβατίνες, ο Leyshon (1929) και ο Clark (1972) ανέφεραν παλαιότερα ότι η μαστίτιδα εκδηλωνόταν πιο συχνά σε περιόδους με κρύες καιρικές συνθήκες. Αυτό μπορεί να συσχετίζεται με σκασίματα (αλλοιώσεις τύπου "charring") στις θηλές τους, ως αποτέλεσμα των κρύων καιρικών συνθηκών.

Σε θηλές με αλλοιώσεις τύπου "charring" λαμβάνουν χώρα διάφορες φυσικοχημικές αλλαγές στο δέρμα τους. Η αφυδάτωση της επιδερμίδας, η οποία συνοδεύει αυτού του τύπου τις αλλοιώσεις, μειώνει τη συγκέντρωση αντιβακτηριακών λιπαρών οξέων, βακτηριοστατικών πρωτεϊνών και ανοσοσφαιρινών (Noble & Somerville 1974). Παράλληλα, μεταβάλλεται η βακτηριακή χλωρίδα του δέρματος, με αποτέλεσμα τη μείωση της αντίστασής του στη

αποικιοποίηση από παθογόνα βακτήρια (Fox & Cumming 1995). Στον πειραματισμό που περιγράφεται στο Κεφάλαιο V, Τμήμα B, μετά τη διαδικασία πρόκλησης αλλοιώσεων τύπου "chapping" και την εμφάνιση της θηλής στο ζώο με *M. haemolytica*, το βακτήριο απομονώθηκε για μακρό χρονικό διάστημα σε καθαρή καλλιέργεια από το δέρμα, επιβεβαιώνοντας έτσι τα παραπάνω.

Σε δέρμα με αλλοιώσεις τύπου "chapping" αφενός καταστρέφεται ο όξινος προστατευτικός μανδύας του δέρματος (Raab 1990, Skripkin, Fyodorov, Selisky, Somon, Alchanghyan & Nemenko 1992) και αφετέρου, λόγω των εκδορών και των σχισμών, αυξάνεται η συνολική επιφάνεια του δέρματος της θηλής, υποβοηθώντας έτσι την πιο εύκολη προσκόλληση των βακτηρίων και τη δημιουργία συσσωματωμάτων (Sieber & Farnsworth 1984, Fox και συν. 1991). Η ανεύρεση συσσωματωμάτων βακτηρίων στην εξωτερική επιφάνεια της επιδερμίδας των θηλών των ζώων της ομάδας Δ, σε αντίθεση με την απουσία τους από το αντίστοιχο σημείο στα ζώα της ομάδας ΣΤ, υποδηλώνει την ευκολία στην προσκόλληση και τον πολλαπλασιασμό τους.

Οι Scott και Jones (1998) απομόνωσαν *M. haemolytica* από το δέρμα της θηλής προβάτων που θηλάζονταν, αλλά όχι από το δέρμα θηλών έγκυων προβάτων. Στη συνέχεια, οι Jones και Watkins (2001) πρότειναν ότι ο μικροοργανισμός πιθανόν προερχόταν από τη στοματική κοιλότητα των αμνών που θηλάζαν τις προβατίνες. Έτσι, μπορεί κάποιος να υποθέσει ότι σε καιρικές συνθήκες με χαμηλή θερμοκρασία, οπότε τα νεογέννητα προσεγγίζουν πιο συχνά τις θηλές της μητέρας τους (Slee & Springbett 1986, Reif, Field & Diego 2001) και οπότε υπάρχει προδιάθεση ανάπτυξης αλλοιώσεων τύπου "chapping" (Fox & Hancock 1989, Burmeister και συν. 1995), ο θηλασμός από τους αμνούς συμβάλλει στη μεταφορά *M. haemolytica* στο δέρμα της θηλής. Έτσι, το βακτήριο μπορεί να εισέλθει πιο εύκολα στο θηλαίο πόρο και στη συνέχεια να προκαλέσει μαστίτιδα, όπως επιβεβαιώνεται από τα αποτελέσματα του πειραματισμού. Με την υπόθεση αυτήν μπορεί να ερμηνευτούν και τα ευρήματα του Leyshon (1929) και του Clark (1972).

Επιπλέον, ο Cheville (1994) ανέφερε ότι στο κατεστραμμένο δέρμα υπήρχε μειωμένη ανταπόκριση και ελαττωματική χημειοτακτική ικανότητα των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων, επιτρέποντας έτσι την εισβολή βακτηρίων. Επιπλέον, τα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα καταστρέφονται στο χαμηλό pH και την υψηλή θερμοκρασία που αναπτύσσονται στους φλεγμαίνοντες ιστούς (Jacques & Bainton 1978, Harlan και συν. 1985). Ανάλογη υπόθεση έγινε και προηγουμένως όσον αφορά στην προδιάθεση των ζώων σε μαστίτιδα σε περιπτώσεις σταφυλοκοκκικής δερματίτιδας στο δέρμα του μαστού.

Τέλος, η έκθεση των θηλών σε τραυματισμούς ή σε χαμηλή θερμοκρασία περιβάλλοντος προκαλεί καταστροφή των κοκκίων των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων και λύση των σιτευτικών κυττάρων (Henderson, Chi & Klebanoff 1980), τα οποία παίζουν αμυντικό ρόλο στα αρχικά στάδια της φλεγμονής (Galli, Dvorak & Dvorak 1984). Μπορεί λοιπόν κάποιος να υποθέσει ότι παρόμοια σειρά γεγονότων λαμβάνει χώρα και σε θηλές με αλλοιώσεις τύπου "chapping", αναστέλλοντας έτσι τους φυσιολογικούς αμυντικούς μηχανισμούς στο μαστικό αδέννα.

Τα αποτελέσματα των δύο πειραματισμών συμφωνούν με τις κλινικές παρατηρήσεις που έχουν γίνει από την πλειονότητα των συγγραφέων και επιβεβαιώνουν ότι οι παθήσεις των θηλών προδιαθέτουν τα ζώα σε μαστίτιδα, επηρεάζοντας αρνητικά τους αμυντικούς μηχανισμούς του μαστικού αδέννα.

Σημασία του λεμφικού ιστού στη θηλή

Το σύνολο των παραπάνω ευρημάτων υπογραμμίζει τη σημασία του σχηματισμού λεμφικού ιστού στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου ως αμυντικού σχηματισμού για το μαστικό αδέννα. Ο λεμφικός αυτός ιστός αναπτύσσεται σε "στρατηγικό" σημείο, στην είσοδο του θηλαίου κόλπου, παρέχοντας προστασία κατά των εισβαλλόντων μικροοργανισμών.

Οι περιοχές λεμφικού ιστού που βρίσκονται στους βλεννογόνους αποτελούν δευτερογενή λεμφοειδή όργανα. Στις περιοχές αυτές εκδηλώνεται η πρώτη ανταπόκριση του ξενιστή έναντι των αντιγόνων, τα οποία εισβάλλουν στους βλεννογόνους (Lydyard & Rossi 2001). Η δραστηριοποίηση αυτών των περιοχών αρχίζει, οπότε αυξάνεται και το μέγεθός τους, ως ανταπόκριση σε κάποιο αντιγονικό ερέθισμα στο βλεννογόνο. Από τα ευρήματα στο Κεφάλαιο II, Τμήμα Δ, φαίνεται ότι ακόμη και η ύπαρξη βακτηριακής χλωρίδας μπορεί να προκαλέσει τη δραστηριοποίηση αυτού του ιστού. Ανάλογα ευρήματα έχουν αναφερθεί στους βρόγχους, όπου φαίνεται ότι αναπτύσσεται ανάλογος σχηματισμός ακόμη και μετά από ήπια αντιγονική προσβολή (Moyron-Quiroz, Rangel-Moreno, Kusser, Hartson, Sprague, Goodrich, Woodland, Lund & Randall 2004), καθώς επίσης και στο λεπτό έντερο των ανθρώπων και των τρωκτικών (Lorenz, Chaplin, McDonald, McDonough & Newberry 2003, Newberry & Lorenz 2005). Οι ερευνητές αυτοί ανέφεραν ότι αυτές οι λεμφοειδείς κατασκευές λειτουργούν ως περιοχές του ανοσοποιητικού συστήματος στους βλεννογόνους, προάγοντας έτσι τη συγκέντρωση και την αύξηση του αριθμού των ειδικών λεμφοκυττάρων στην υποβλεννογόνια στιβάδα.

Οι λεμφικοί ιστοί που αναπτύσσονται στους βρόγχους θεωρείται ότι είναι μία συνάθροιση διαφοροποιημένων λεμφοκυττάρων που αρχικά ενεργοποιήθηκαν σε πρωτογενή λεμφικά όργανα κατά τη διάρκεια προηγούμενων αναπνευστικών μολύνσεων. Επιπλέον, οι λεμφικοί ιστοί στους βρόγχους είναι ιδιαίτερα αναπτυγμένοι μετά από πολλαπλές αναπνευστικές λοιμώξεις (Mouyon-Quiroz και συν. 2004). Σε κάθε φλεγμονώδη αντίδραση ενεργοποιείται άμεσα αυτός ο λεμφικός ιστός και προάγεται η συγκέντρωση και η επέκταση των ειδικών λεμφοκυττάρων στην περιοχή. Πιθανόν, ανάλογη διαδικασία λαμβάνει χώρα και όσον αφορά στο σχηματισμό του λεμφικού ιστού στη θηλή.

Στα δείγματα θηλών από τα σφαγεία βρέθηκε λεμφικός ιστός, η δε παρουσία του συσχετίστηκε με την απομόνωση βακτηρίων από το θηλαίο πόρο. Μόνο σε ορισμένα από αυτά παρατηρήθηκαν ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα και βλαστική δραστηριότητα στο λεμφικό ιστό. Στα δείγματα του πειραματισμού που περιγράφεται στο Κεφάλαιο III, Τμήμα Β, βρέθηκαν ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα και βλαστική δραστηριότητα σε όλα τα πειραματόζωα, τα οποία ενοφθαλμίστηκαν στο θηλαίο πόρο ή στο δέρμα της θηλής. Η παρουσία ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων και βλαστικής δραστηριότητας αποτελεί ένδειξη πρόσφατης μόλυνσης (η οποία είχε γίνει πειραματικά). Αντίθετα, σε όσα δείγματα θηλών από το σφαγείο παρατηρήθηκε λεμφικός ιστός χωρίς ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα, προφανώς η μόλυνση ήταν παλαιότερη και πλέον είχε επέλθει ισορροπία μεταξύ της βακτηριακής χλωρίδας στο θηλαίο πόρο και των αμυντικών μηχανισμών του ζώου.

Στα δείγματα θηλών από τα κλινικά περιστατικά, καθώς και στα δείγματα από τα πειραματόζωα με ιογενείς αλλοιώσεις στις θηλές (Κεφάλαιο V, Τμήμα Β) δε βρέθηκε λεμφικός ιστός. Ο ενοφθαλμισμός *M. haemolytica* στο θηλαίο πόρο των ζώων αυτού του πειραματισμού κατέληξε σε υπεροξεία κλινική μαστίτιδα. Συνεπώς, είναι πιθανόν οι αλλοιώσεις στις θηλές να επιδρούν αρνητικά στην ανάπτυξη λεμφικού ιστού, με αποτέλεσμα την ανεπάρκεια των τοπικών αμυντικών μηχανισμών στη θηλή.

Σημειώνεται ότι οι Kraft, Bachmann, Bachmann, Buerki, Hess, Cottier και Stoner (1987) ανέφεραν ότι η λειτουργικότητα των δευτερογενών λεμφικών ιστών μειώνεται με της πάροδο της ηλικίας. Όπως ήδη αναφέρθηκε, η αύξηση του ποσοστού προσβολής από μαστίτιδα έχει συσχετιστεί με την πάροδο της ηλικίας και τον αριθμό της γαλακτικής περιόδου (Kirk και συν. 1980, Watson και συν. 1990, Watkins και συν. 1991, Ahmad και συν. 1992, Fthenakis 1994, Sevi και συν. 2000, Leitner και συν. 2001). Είναι πιθανόν αυτή η αύξηση να οφείλεται σε ανεπάρκεια των αμυντικών κυτταρικών μηχανισμών της θηλής, ακριβώς λόγω της μειωμένης λειτουργικότητας του λεμφικού ιστού με την πάροδο της ηλικίας των ζώων. Άλλωστε στην παρούσα μελέτη δε βρέθηκε διαφορά στην πιθανότητα μόλυνσης της θηλής και του μαστικού

αδένα μεταξύ πρωτότοκων και πολύτοκων προβάτων (Κεφάλαιο II, Τμήμα Γ). Προφανώς λοιπόν, τα αίτια σχετίζονται με την αμυντική ικανότητα της θηλής και του μαστικού αδένα στις δύο κατηγορίες ζώων.

Από όλα τα παραπάνω φαίνεται η σημασία του λεμφικού ιστού στη θηλή των προβάτων -η παρουσία του οποίου αναφέρεται για πρώτη φορά- ως αμυντικού μηχανισμού του μαστού. Η περαιτέρω μελέτη της φύσης αυτού του λεμφικού ιστού (π.χ. με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους) θα παρουσιάσει πολύτιμες πληροφορίες, σχετικά με την ακριβή πορεία της φλεγμονής και τις δυνατότητες βελτίωσης της ανοσολογικής ανταπόκρισης του βλεννογόνου στο θηλαίο πόρο.

Τα παρόντα ευρήματα ενισχύουν την υπόθεση ότι ο μαστικός αδένας (και άλλα μη λεμφοειδή όργανα) μπορεί να αναπτύξει τοπική ανοσολογική ανταπόκριση. Η ανοσολογική ανταπόκριση που αναπτύσσεται τοπικά στους ιστούς έχει αποδειχθεί ότι προστατεύει τα όργανα, αλλά λειτουργεί διαφορετικά από αυτήν που αναπτύσσεται σε πρωτογενή λεμφοειδή όργανα (Μογρον-Quiroz και συν. 2004). Οι παραδοσιακές μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί για την προστασία των προβάτων από μαστίτιδα με εμβολιασμό των ζώων, έχουν βασιστεί στη βελτίωση της συστηματικής αμυντικής ικανότητας των ζώων. Όμως δε θεωρούνται επιτυχείς (Menzies & Ramanoon 2001). Έτσι, η περαιτέρω μελέτη των ιδιοτήτων αυτού του ιστού μπορεί να παράσχει πληροφορίες σχετικά με τη βελτίωση της ανοσοπροφύλαξης κατά της μαστίτιδας. Πιθανόν, εμβόλια που θα αποσκοπούσαν στη βελτίωση της ανοσολογικής ανταπόκρισης του βλεννογόνου στο θηλαίο πόρο, να μπορούσαν να παράσχουν πιο αποτελεσματική άμυνα κατά των εισβαλλόντων μικροοργανισμών (Newberry & Lorenz 2005).

Σε προηγούμενες μελέτες στην παθογένεια της μαστίτιδας από *M. haemolytica* (El-Masannat 1987, Watkins 1990, Vaz 1994) δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση στο ρόλο του μικροοργανισμού. Όμως, τα ευρήματα ότι (α) δύο διαφορετικά στελέχη *M. haemolytica* (από τα οποία το ένα απομονώθηκε από υγιές ζώο) προκάλεσαν μαστίτιδα στις ίδιες ακριβώς συνθήκες (β) από το σημείο όπου ενοφθαλμίστηκαν τα βακτήρια, καθορίστηκε η έκβαση της μόλυνσης και (γ) η κατάσταση της υγείας των θηλών ήταν σημαντική για την έκβαση της πειραματικής μόλυνσης, αποδεικνύουν και τη σημασία του ξενιστή στην παθογένεια της ασθένειας. Αυτό μπορεί να αποτελέσει αντικείμενο ενδιαφέρουσας περαιτέρω ερευνητικής δραστηριότητας.

Επίλογος

Συμπεράσματα

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

(α) Η χρήση στείρου, λεπτού, πλαστικού καθετήρα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη λήψη υλικού από το θηλαίο πόρο προβάτων.

- Η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μελέτες της οικολογίας των βακτηρίων στη θηλή.
- Η χρήση της μεθόδου σε ζεύγη δειγμάτων από το θηλαίο πόρο μπορεί να παράσχει πληροφορίες σχετικές με τη δυναμική της μόλυνσης.

(β) Η υγιής θηλή παρέχει αποτελεσματική προστασία στο μαστικό αδένα κατά των εισβαλλόντων μικροοργανισμών.

- Στο θηλαίο πόρο βρίσκονται συχνά βακτήρια, τα οποία όμως δεν εισβάλλουν στο μαστικό παρέγχυμα.
- Η θηλή παρέχει αποτελεσματική προστασία από παθογόνα στελέχη *M. haemolytica*, μετά από ενοφθαλμισμό στο θηλαίο πόρο.

(γ) Η διαδικασία άρμεξης προδιαθέτει στην είσοδο βακτηρίων στη θηλή. Όμως, η είσοδος στη θηλή δεν καταλήγει σε αυξημένη εισβολή στο μαστικό παρέγχυμα.

(δ) Ο λεμφικός ιστός στο όριο μεταξύ θηλαίου πόρου και θηλαίου κόλπου φαίνεται ότι αποτελεί σχηματισμό με σημαντική αμυντική δραστηριότητα.

- Ο λεμφικός ιστός βρίσκεται και σε κλινικά υγιείς θηλές με βακτηριακή χλωρίδα.
- Σε περιπτώσεις πρόσφατης μόλυνσης, ο λεμφικός ιστός παρουσιάζει βλαστική δραστηριότητα.
- Οι τοπικοί αμυντικοί μηχανισμοί στη θηλή φαίνεται ότι είναι ιδιαίτερης σημασίας στην άμυνά της.

(ε) Οι παθήσεις των θηλών προδιαθέτουν τις προβατίνες σε μαστίτιδα.

- Διάφοροι μηχανισμοί εμπλέκονται στην προδιάθεση των ζώων σε μαστίτιδα.
- Σε περιπτώσεις παθήσεων των θηλών οι αμυντικοί μηχανισμοί της θηλής δεν μπορούν να αντιμετωπίσουν αποτελεσματικά τους εισβάλλοντες μικροοργανισμούς, με αποτέλεσμα την εκδήλωση μαστίτιδας.
- Η διαδικασία πρόκλησης αλλοιώσεων τύπου "charring" στις θηλές αποτελεί χρήσιμο πρότυπο για τη μελέτη των παθήσεών τους.

Προοπτικές

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

- Μελέτη της δυναμικής της μόλυνσης της θηλής, σε σχέση με το θηλασμό ή τη μηχανική άρμεξη.
- Μελέτη του ρόλου της βακτηριακής χλωρίδας στη θηλή αφενός στην αντιμετώπιση των εισβαλλόντων μικροοργανισμών και αφετέρου στην προδιάθεση των ζώων σε μαστίτιδα.
- Μελέτη της πρώιμης φάσης της εισόδου των βακτηρίων στη θηλή, ώστε να εξακριβωθούν πλήρως τα στάδια έκφρασης των αμυντικών μηχανισμών της θηλής.
- Μελέτη της σημασίας του λεμφικού ιστού στη θηλή, ως αμυντικού μηχανισμού για το μαστικό αδένα.

Από τις μελέτες στη σημασία του ξενιστή στην παθογένεια της ασθένειας, μπορεί να προκύψουν στοιχεία για τη βελτίωση της ανοσολογικής ανταπόκρισης του στη μόλυνση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

- Αδαμίδης Σ (1980). Έρευνα επί της δυνατότητας ανοσοποίησης των αιγοπροβάτων κατά της γαγγραινώδους μαστίτιδας δια του εμβολίου Covexin. *Πρακτικά 1ου Πανελληνίου Κτηνιατρικού Συνεδρίου*, Αθήνα, τομ. 2, σελ. 193-203.
- Ζδράγκας Α, Τσάκος Π, Κοτζαμανίδης Χ, Ανατολιώτης Κ, Τσακνάκης Η (2005). Ο *Streptococcus agalactiae* ως αιτιολογικός παράγοντας σφοδρής κλινικής μαστίτιδας προβάτων. *Περιοδικό της ελληνικής κτηνιατρικής Εταιρείας* 56:114-121.
- Κοτανίδης ΓΙ (2003). *Συμβολή στη Μελέτη και την Πρόληψη των Μαστίτιδων των Προβάτων*. Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Κτηνιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.
- Μιχαήλ ΣΓ (1990). *Συγκριτική Ανατομική των Κατοικίδιων Θηλαστικών*, 2η έκδ. Αφοι Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη.
- Ρώσσης Θ (1972). Έρευνα επί της εκτάσεως των υποκλινικών και χρονίων υποκλινικών σταφυλοκοκκικών μαστίτιδων των αιγοπροβάτων εν τω νομώ Αττικής (Πρώται παρατηρήσεις εν Ελλάδι). *Δελτίον της ελληνικής κτηνιατρικής Εταιρείας* 23:188-199.
- Ρώσσης Θ, Σεϊμένης Ε, Μενασσέ Ι (1972). Έρευνα επί του παθογόνου παράγοντος της γαγγραινώδους μαστίτιδας του προβάτου και της δυνατότητας αντιμετώπισεως της νόσου δι' ανοσοποίησης. *Κτηνιατρικά Νέα* 4(1):18-22.
- Σαρρής Κ (1978). *Συμβολή στη Μελέτη των Μυκοπλασμάτων στα Μικρά Μηρυκαστικά*. Διατριβή Υψηγείας, Κτηνιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.
- Ταρλατζής Κ, Φραγκόπουλος Α, Στοφόρος Ε (1963). Γαγγραινώδης μαστίτιδα των προβάτων και των αιγών και ταυτοποίηση του αιτιολογικού παράγοντα *Clostridium perfringens* τύπος C. *Δελτίον της ελληνικής κτηνιατρικής Εταιρείας* 15:88-95.
- Υψηλάντης Σ, Σαρρής Κ, Παπαδόπουλος Ο (1988). Μικροβιολογία των υποκλινικών μαστίτιδων στα πρόβατα. *Δελτίον της ελληνικής κτηνιατρικής Εταιρείας* 39:266-275.
- Φθενάκης ΓΧ (1992). Μαστίτιδα των προβάτων. *Δελτίον της ελληνικής κτηνιατρικής Εταιρείας* 43:155-163.

- Φθενάκης ΓΧ (1993). *Φυσιοπαθολογία του Μαστικού Αδένα των Προβάτων*. Αγροτικές Εκδόσεις, Αθήνα.
- Φθενάκης ΓΧ, Jones JET (1990). Συχνότητα και αιτιολογία της κλινικής μαστίτιδας των προβάτων σε κοπάδια της Κεντρικής Μακεδονίας. *Δελτίον της ελληνικής κτηνιατρικής Εταιρείας* 41:133-141.
- Χριστοδούλου Θ (1969). Σταφυλοκοκκικά νοσήματα των ζώων και των πτηνών. *Πρακτικά 2ου Εθνικού Συνεδρίου Μικροβιολογίας*, Αθήνα, σελ. 42-49.
- Adams DO, Hamilton TA (1988). Phagocytic cell: cytotoxic activities of macrophages. In: JI Gallin, R Snyderman (eds) *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. Raven Press, New York, USA, pp. 471-492.
- Agger JF, Hesselholt M (1996). Epidemiology of teat lesions in a dairy herd. 1. Description of incidence, location and clinical appearance. *Nordisk Veterinaer Medicin* 38:209-219.
- Agger JF, Willeberg P (1986). Epidemiology of teat lesions in a dairy herd. 2. Associations with subclinical mastitis. *Nordisk Veterinaer Medicin* 38:220-232.
- Aguilar B, Iturralde M (2001). Binding of surface protein of *Staphylococcus aureus* to cultured ovine mammary gland epithelial cells. *Veterinary Microbiology* 82:165-175.
- Ahmad G, Timms LL, Morrical DG, Brackelsberg PO (1992). Dynamics and significance of ovine subclinical intramammary infections and their effects on lamb performances. *Sheep Research Journal* 8:25-29.
- Al-Majali AM, Jawabreh S (2003). Period prevalence and etiology of subclinical mastitis in Awassi sheep in southern Jordan. *Small Ruminant Research* 47:243-248.
- Al-Sultan II, Aitken ID (1984). Promotion of *Pasteurella haemolytica* infection in mice by iron. *Research in veterinary Science* 36:385-386.
- Alacam E, Dinc DA, Guler M, Elma E (1990). Occurrence and radiological diagnosis of teat alterations in dairy cows. *Deutsche Tierarztliche Wochenschrift* 97:523-525.
- Albenzio M, Taibi L, Caroprese M, Marino R, Muscio A (2003). Immune response, udder health and productive traits of machine milked induced and suckling ewes. *Small Ruminant Research* 48:189-200.
- Albenzio M, Taibi L, Muscio A, Sevi A (2002). Prevalence and etiology of subclinical mastitis in intensively managed flocks and related changes in the yield and quality of ewe milk. *Small Ruminant Research* 43:219-226.
- Alsenosy AM, Dennis SM (1985). Pathology of acute experimental *Actinobacillus seminis*

- mastitis in ewes. *Australian veterinary Journal* 62:234-237.
- Anderson KL, Smith AR, Shanks RD, Whitmore HL, Davis LE, Gustafsson BK (1986). Endotoxin-induced bovine mastitis: immunoglobulins, phagocytosis, and effect of flunixin meglumine. *American Journal of veterinary Research* 47:2405-2410.
- Angen O, Aalbaek B, Falsen E, Olsen JE, Bisgaard M (1997). Relationships among strains classified with the ruminant *Pasteurella haemolytica*-complex using quantitative evaluation of phenotypic data. *Zentralblatt fur Bakteriologie* 285:459-479.
- Angen O, Caugant DA, Olsen JE, Bisgaard M (1997). Genotypic relationships among strains classified under the (*Pasteurella*) *haemolytica*-complex as indicated by ribotyping and multilocus enzyme electrophoresis. *Zentralblatt fur Bakteriologie* 286:333-354.
- Angen O, Mutters R, Caugant DA, Olsen JE, Bisgaard M (1999). Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov. *International Journal of systematic Bacteriology* 49:67-86.
- Angen O, Olsen JE, Bisgaard M (1999). Further studies of the relationships among strains classified as taxon 15, taxon 18, taxon 20, (*Pasteurella*) *granulomatis* or the (*Pasteurella*) *haemolytica*-complex in ruminants using quantitative evaluation of phenotypic data. *Zentralblatt fur Bakteriologie* 286:317-332.
- Ariznabarreta A, Gonzalo C, San Primitivo F (2002). Microbiological quality and somatic cell count of ewe milk with special reference to staphylococci. *Journal of Dairy Science* 85:1370-1375.
- Arnaout MA, Melamed J, Tack BF, Colten HR (1981). Characterization of the human complement (c3b) receptor with a fluid phase C3b dimer. *Journal of Immunology* 127:1348-1354.
- Ayling RD, Bashiruddin SE, Nicholas RA (2004). Mycoplasma species and related organisms isolated from ruminants in Britain between 1990 and 2000. *The veterinary Record* 155:413-416.
- Baggiolini M, Horisberger U, Gennaro R, Dewald B (1985). Identification of three types of granules in neutrophils of ruminants. Ultrastructure of circulating and maturing cells. *Laboratory Investigation* 52:151-158.

- Bakken G (1980). Findings of parasites in teat sores (summer sores) of cows. A case report. *Norsk Veterinærtidsskrift* 92:99-102.
- Ball HJ (1990). Experimental mastitis caused by *Mycoplasma bovis* and *M. canadense* in the ewe. *Veterinary Microbiology* 22:383-388.
- Ball HJ, Mackie DP (1986). Experimental production of bovine and ovine mastitis with *Mycoplasma canadense* isolate. *The veterinary Record* 118:72-73.
- Banks JG, Tranter HS (1985). Lysozyme. *Proceedings of Symposium on Natural Antimicrobial Systems*, Bath, England, pp. 38-48.
- Bareham JR (1976). Behaviour of lambs on the 1st day after birth. *British veterinary Journal* 132:152-162.
- Barillet F, Rupp R, Mignon-Grasteau S, Astruc JM, Jacquin M (2001). Genetic analysis for mastitis resistance and milk somatic cell score in French Lacaune dairy sheep. *Genetique-Selection-Evolution* 33:397-415.
- Baro JA, Carriedo JA, San Primitivo F (1994). Genetic parameters of test day measure for somatic cell count, milk yield and protein percentage of milking ewes. *Journal of Dairy Science* 77:2568-2662.
- Barone R (2001). *Comparative Anatomy of Domestic Mammals*, vol. 4, Editions Vigot, Paris.
- Barrio B, Vangroenweghe F, Dosogne H, Burvenich C (2000). Decreased neutrophil bactericidal activity during phagocytosis of a slime-producing *Staphylococcus aureus* strain. *Veterinary Research* 31:603-609.
- Barrow GI, Feltham RKA (1993). *Manual for the Identification of Medical Bacteria*, 3rd edn. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bassam LS, Hasso SA (1987). Mastitis in goats caused by *Nocardia asteroides*. *Small Ruminant Research* 26:287-290.
- Batavani RA, Mortaz E, Falahian K, Dawoodi MA (2003). Study on frequency, etiology and some enzymatic activities of subclinical ovine mastitis in Urmia, Iran. *Small Ruminant Research* 50:45-50.
- Baumgartner W, Pernthaler A, Eibl G (1992). Influence of the lactation period on the cell count of milk samples of ewes. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 99:213-216.
- Beltran de Heredia F, Iturritza J (1988). Counting of somatic cells in the milk of ewes. *Medecina Veterinaria* 5:33-38.
- Berggren KA, Baluyut CS, Simonson RR, Bemrick WJ, Maheswaran SK (1981). Cytotoxic effects of *Pasteurella haemolytica* on bovine neutrophils. *American Journal of veterinary Research* 42:1383-8.

- Bergonier D, Berthelot X (2003). New advances in epizootiology and control of ewe mastitis. *Livestock Production Science* 79:1-16.
- Bergonier D, Berthelot X, Poumarat F (1997). Contagious agalactia of small ruminants: current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control. *Revue de Science technique* 16:848-873.
- Bergonier D, Blanc MJ, Fleury B, Lagriffoul G, Barillet F, Berthelot X (1997). Mastitis in dairy sheep and goats: aetiology, epidemiology, control. *Proceedings des Rencontres de Recherche Ruminants* 4:251-260.
- Bergonier D, De Cremoux R, Rupp R, Lagriffoul G, Berthelot X (2003). Mastitis of dairy small ruminants. *Veterinary Research* 34:689-716.
- Bergonier D, Lagriffoul G, Barillet F, Berthelot X (1999). Aetiology and tools for control of mammary infections in sheep and goats. *Proceedings des Journées nationales GTV-INRA Nantes, France*, pp. 487-496.
- Bergonier D, Lagriffoul G, Berthelot X, Barillet F (1996). Non-infectious factors of variation for somatic cell counts in dairy sheep and goats. *Proceedings of the International Symposium on Somatic Cells and Milk of Small Ruminants*, Bella, Italy, pp. 113-135.
- Bergonier D, Poumarat F (1996). Contagious agalactia of small ruminants: epidemiology, diagnosis and control. *Revue scientifique et technique de l' Office internationale des Epizooties* 15:1431-1475.
- Berthelot X, Lagriffoul G, Concordet D, Barillet F, Bergonier D (2005). Physiological and pathological thresholds of somatic cell counts in ewe milk. *Proceedings of the 6th International Sheep Veterinary Congress*, Hersonissos, Greece, pp. 40-43.
- Berriatua E, Ziluga I, Miguel Virto C, Uribarren P, Juste R, Laevens S, Vandamme P, Govan JRW (2001). Outbreaks of subclinical mastitis in a flock of dairy sheep associated with *Burkholderia cepacia* complex infection. *Journal of clinical. Microbiology* 39:990-994.
- Beytut E, Akca A, Bain O (2005). Teat onchocercosis in cows with reference to prevalence, species involved and pathology. *Research in veterinary Science* 78:45-51.
- Biberstein EL, Gills MG, Knight H (1960). Serological types of *Pasteurella haemolytica*. *Cornell Veterinarian* 50:283-300.
- Bisgaard M (1993). Ecology and significance of Pasteurellaceae in animals. *Zentralblatt fur Bakteriologie* 279:7-26.
- Bjork L (1985). The lactoperoxidase system. *Proceedings of Symposium on Natural Antimicrobial Systems*, Bath, England, pp. 18-30.

- Blood DC, Radostits OM, Henderson JA (1983). *Veterinary Medicine*, 6th edn. Baillière-Tindal, London, England.
- Bocklisch H, Kreusel S, Brys A, Pfutzner H (1991). Experimental infection of the udder of ewe due to *Mycoplasma bovis*. *Zentralblatt fur Veterinarmedizin* 38:385-390.
- Bor A, Winkler M, Gootwine E (1989). Non-clinical intramammary infection in lactating ewes and its association with clinical mastitis. *British veterinary Journal* 145:178-184.
- Bowersock TL, Walker RD, Maddux JM, Fenner D, Moore RN (1990). Hematological changes in calves exposed to a mixture of lipopolysaccharide and crude leukotoxin of *Pasteurella haemolytica*. *Canadian Journal of veterinary Research* 54:415-21.
- Bramley AJ (1992). Milk hygiene and machine milking. In: AJ Bramley, FH Dodd, GA Mein, JA Bramley (eds) *Machine Milking and Lactation*. Insight Books, Berkshire, England, pp. 343-372.
- Bredal WP, Thoresen SI, Rimstad E, Aleksandersen M, Nafstad PHJ (1996). Diagnosis and clinical course of canine oral papillomavirus infection. *Journal of small Animal Practice* 37:138-142.
- Breider MA, Kumar S, Corstvet RE (1990). Bovine pulmonary endothelial cell damage mediated by *Pasteurella haemolytica* pathogenic factors. *Infection and Immunity* 58:1671-1677.
- Bridre J (1907). Gargrenous mastitis of dairy ewes: pathogenesis and vaccination. *Bulletin de la Societe centrale de Medecine veterinaire* 61:500-506.
- Brogden KA, Lehmkuhl HD, Cutlip RC (1998). *Pasteurella haemolytica* complicated respiratory infections in sheep and goats. *Veterinary Research* 29:233-254.
- Bulgin MS, Adams S, Duelke B (1985). Firm udder in periparturient ewes with lymphocytic accumulations, retrovirus infection, and milk unavailable at the teat. *Journal of the american veterinary medical Association* 186:391-392.
- Burmeister JE, Fox LK, Hancock DD, Gay CC, Gay JM, Parish SM, Tyler JW (1995). Survey of dairy managers in the Pacific Northwest identifying factors associated with teat chapping. *Journal of Dairy Science* 78:2073-2082.
- Burriel AR (1994). *A Study of Coagulase-negative Staphylococci associated with Subclinical Mastitis in Sheep*. Ph.D. thesis, The Royal Veterinary College, University of London.
- Burriel AR (1997). Udder orf infection and its role in ovine clinical mastitis caused by *Pasteurella haemolytica*. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 11:28-31.
- Burriel AR (1998). Isolation of coagulative-negative staphylococci from the milk and the environment of sheep. *Journal of Dairy Research* 65:139-142.

- Burriel AR (2000). Somatic cell counts determined by the Coulter or Fossomatic Counter and their relationship to administration of oxytocin. *Small Ruminant Research* 35:81-84.
- Burriel AR, Dagnall GJR (1997). Leukotoxic factors produced by staphylococci of ovine origin. *Microbiology Research* 152:247-250.
- Bushnell RB, Brazil L, Jasper DE (1978). Mechanization of hygienic practices. *Proceedings of International Symposium on Machine Milking (17th Annual Meeting of National Mastitis Council)*, Louisville, USA, pp. 400-411.
- Buttner M, Rziha HJ (2002). Parapoxviruses: from the lesion to the viral genome. *Journal of veterinary Medicine B* 49:7-16.
- Calavas D, Bugnard F, Ducrot C, Sulpice P (1998). Classification of the clinical types of udder disease affecting nursing ewes. *Small Ruminant Research* 29:21-31.
- Capuco AV, Bright SA, Pankey JW, Wood DL, Miller RH, Bitman J (1992). Increased susceptibility to intramammary infection following removal of teat canal keratin. *Journal of Dairy Science* 75:2126-2130.
- Capuco AV, Paape MJ, Nickerson SC (1986). In vitro study of polymorphonuclear leukocyte damage to mammary tissues of lactating cows. *American Journal of veterinary Research* 47:663-668.
- Carlo AL di, Paape MJ, Miller RH (1996). Reactivity of purified complement component 3b with bovine neutrophils and modulation of complement receptor 1. *American Journal of veterinary Research* 57:151-156.
- Carlsson A, Bjork L, Persson K (1989). Lactoferrin and lysozyme in milk during acute mastitis and their inhibitory effect in Delvotest P. *Journal of Dairy Science* 72:3166-3175.
- Caroprese M, Sevi A, Schena L, Annichiarico G, Muscio A (2005). Immune response of single and twin lambed Comisan-breed ewes during the transition period. *Proceedings of the 6th International Sheep Veterinary Congress, Hersonissos, Greece*, pp. 156-157.
- Caswell JL, Middleton DM, Gordon JR (2001). The importance of interleukin-8 as a neutrophil chemoattractant in the lungs of cattle with pneumonic pasteurellosis. *Canadian Journal of veterinary Research* 65:229-232.
- Cheville NF (1994). *Ultrastructural Pathology: an Introduction to Interpretation*. Iowa State University Press, Ames, USA.
- Chew BP, Michal JJ, Wong TS, Heirman LR (1991). Effects of lactoferrin on mammary polymorphonuclear leukocyte function in dairy cow. *Journal of Dairy Science* 74(Suppl. 1):166.

- Christopouloupoulos G (2005). Maedi-Visna: clinical review and short references on the disease status in Mediterranean countries. *Proceedings of the 6th International Sheep Veterinary Congress*, Hersonissos, Greece, pp. 51-55.
- Clark RG (1972). Field observations on ovine mastitis. *Proceedings of the 2nd Seminar of the New Zealand Veterinary Association Sheep and Beef Cattle Society*, Palmerston North, New Zealand, pp. 47-54.
- Clark RG (1980). Ovine mammary diseases. A review. *Proceedings of the 10th Seminar of New Zealand Veterinary Association Sheep and Beef Cattle Society*, Canterbury, New Zealand, pp.16-29.
- Clements ACA, Taylor DJ, Fitzpatrick JL (2003). Evaluation of diagnostic procedures for subclinical mastitis in meat-producing sheep. *Journal of Dairy Research* 70:139-148.
- Colditz IG, Maas PJCM (1987). The inflammatory activity of activated complement in ovine and bovine mammary glands. *Immunology and Cell Biology* 65:433-436.
- Colditz IG, Persson BL (1988). Kinetics of endotoxin-induced inflammation in ovine mammary gland. *Inflammation* 12:491-501.
- Collins RA, Oldham G (1986). Proliferative responses and IL-2 production by mononuclear-cells from bovine mammary secretions, and the effect of mammary secretions on peripheral-blood lymphocytes. *Immunology* 58:647-651.
- Collins RA, Parsons KR, Bland AP (1986). Antibody containing cells and specialized epithelial cells in the bovine teat. *Research in veterinary Science* 41:50-55.
- Collins RA, Parsons KR, Field TR, Bramley AJ (1988). Histochemical localization and possible antibacterial role of xanthine oxidase in bovine mammary gland. *Journal of Dairy Research*, 55:25-32.
- Confer AW (1993). Immunogens of *Pasteurella*. *Veterinary Microbiology* 37:353-368.
- Confer AW, Panciera RJ, Clinkenbeard KD, Mosier DA (1990). Molecular aspects of virulence of *Pasteurella haemolytica*. *Canadian Journal of veterinary Research* 54:48-52.
- Confer AW, Simmons KR (1986). Effects of *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharide on selected functions of bovine leukocytes. *American Journal of veterinary Research* 47:154-157.
- Craven N (1986). Chemotactic factors for bovine neutrophils in relation to mastitis. *Comparative Immunology, Microbiology and infectious Diseases* 9:29-36.
- Craven RC, Confer AW, Gentry MJ (1991). Cloning and expression of a 30 kDa surface antigen of *Pasteurella haemolytica*. *Veterinary Microbiology* 27:63-78.
- Craven N, Williams MR (1985). Defences of the bovine mammary gland against infection and

- prospects for their enhancement. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 10:71-127.
- Cutlip RC, Lehmkuhl HD, Brodgen KA, Bolin SR (1985). Mastitis associated with ovine progressive pneumonia virus infection in sheep. *American Journal of veterinary Research* 46:326-328.
- Czuprynski CJ, Noel EJ, Carranza O, Srikumaran S (1991). Activation of bovine neutrophils by partially purified *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Infection and Immunity* 59:3126-3133.
- Daley MJ, Williams T, Dougherty R, Coyle P, Furda G, Hayes P (1993). *Staphylococcus aureus* mastitis: pathogenesis and treatment with bovine interleukin-1 and interleukin-2. *Journal of Dairy Science* 74:4413-4424.
- Daley MJ, Williams T, Dougherty R, Furda G, Hayes P, Coyle P (1993). Prevention and therapy of *Staphylococcus aureus* infections with recombinant cytokines. *Cytokine* 5:276-283.
- Dankow R, Wojtowski J, Matylla P (1998). The influence of somatic cell count on technological suitability of goat's milk for production on rennet cheese. *Proceedings of the 6th Symposium on the Milk of Small Ruminant-Milking and Milk Production of Dairy Sheep and Goats*, Athens, Greece, pp. 483-488.
- Davies RL, McCluskey J, Gibbs HA, Coote JG, Freer JH, Parton R (1994). Comparison of outer-membrane proteins of *Pasteurella haemolytica* expressed in vitro and in vivo in cattle. *General Microbiology* 140:3293-3300.
- Davies RL, Parton R, Coote JG, Gibbs HA, Freer JH (1992). Outer-membrane protein and lipopolysaccharide variation in *Pasteurella haemolytica* serotype A1 under different growth conditions. *General Microbiology* 138:909-922.
- De La Fuente R, Ruiz Santa Quiteria JA, Cid D, Domingo M, Suarez G (1993). Experimental intramammary infection of ewes with *Staphylococcus aureus* subsp *anaerobius*. *Research in veterinary Science* 54:221-226.
- Deinhofer M, Pernthaner A (1993). Differentiation of staphylococci from ewe and goat milk samples. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 100:234-236.
- Deneer HG, Potter AA (1989). Iron-repressible outer-membrane proteins of *Pasteurella haemolytica*. *Journal of general Microbiology* 135:435-43.
- Deutz A, Schuh M, Planner G, Fuchs K (1995). Milk losses caused by chronic mastitis and disorder of secretion as well as success of therapy in milk sheep. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* 82:346-350.
- Doherty ML, Bassett HP (1989). Staphylococcal dermatitis in sheep. *The veterinary Record* 124:470.

- Donachie W (2001). Pasteurellosis. In: WB Martin, ID Aitken (eds) *Diseases of Sheep*, 3rd edn. Blackwell, Oxford, pp. 191-198.
- Doymaz MZ, Sordillo LM, Oliver SP, Guidry AJ (1988). Effects of *Staphylococcus aureus* mastitis on bovine mammary gland plasma cell populations and immunoglobulin concentration in milk. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 20:87-93.
- Duffy J (1983). Mastitis in weaned ewes. *Sheep Farmer* 2(6):12.
- Dungu B, Voster J, Bath GF, Verwoerd DW (2000). The effect of a natural Maedi-Visna virus infection on the productivity of South African sheep. *Onderstepoort Journal of veterinary Research* 67:87-96.
- El-Bahri L, Osman FB, Chadli A, Franke B, (1969). Mastitis in the ewe due to *Candida crusei*. *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis* 46:195-198.
- El-Etreby MF, Abdel-Hamid YM (1970). Experimental ovine mastitis. A pathology study. *Veterinary Pathology* 7:246-254.
- El-Masannat ETS (1987). *Ovine Mastitis with Special Reference to Mastitis caused by Pasteurella haemolytica*. Ph.D. thesis, The Royal Veterinary College, University of London.
- El-Masannat ETS, Jones JET, Scott MJ (1991). The experimental production of mastitis in sheep by intramammary inoculation of *Pasteurella haemolytica*. *Journal of comparative Pathology* 105:455-465.
- El-Saied UM, Carriero JA, San Primitivo F (1998). Heritability of test day somatic cell counts and its relationship with milk yield and protein percentage in dairy ewes. *Journal of Dairy Science* 81:2956-2961.
- Esnal A, Gonzalo C, Garcia M, Escobal I, Contreras A, Marco JC (1999). Strategies of mastitis control and milk quality in sheep farms. *Ovis* 60:69-90.
- Euzeby JP (2005): *Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire*. <http://www.bacdico.net>.
- Fernandez E, Blume V, Garrido P, Collins MD, Mateos A, Dominguez L, Fernandez-Garayzabal JF (2004). *Streptococcus equi* subsp. *ruminatorum* subsp. nov., isolated from mastitis in small ruminants. *International Journal of systematic and evolutionary Microbiology* 54:2291-2296.
- Fernandez-Garayzabal JF, Collins MD, Hutson RA, Fernandez E, Monasterio R, Marco J, Dominguez L (1997). *Corynebacterium mastitidis* sp. nov., isolated from milk of sheep with subclinical mastitis. *International Journal of systematic Bacteriology* 47:1082-1085.

- Fernandez-Garayzabal JF, Collins MD, Hutson RA, Gonzalez I, Fernandez E, Dominguez L (1998). *Corynebacterium camporealensis* sp. nov., associated with subclinical mastitis in sheep. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48:463-468.
- Fernandez-Garayzabal JF, Fernandez E, Las Heras AL, Pascual C, Collins MD, Dominguez L (1998). *Streptococcus parasanguinis*: new pathogen associated with asymptomatic mastitis in sheep. *Emerging Infectious Diseases* 4:645-647.
- Findlay ALR (1971). Neutral and behavioural interactions with lactation. In: IR Falconer (ed) *Lactation*. Butterworths, London, UK, pp.75-91.
- Fitzpatrick JL, Cripps PJ, Hill AW, Bland PW, Stokes CR (1992). MHC class II expression in the bovine mammary gland. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 32:13-23.
- Forestier C, Welch RA (1991). Identification of RTX toxin target cell specificity domains by use of hybrid genes. *Infection and Immunity* 59:4212-4220.
- Fox LK, Cumming MS (1995). Relationship between thickness, chapping and *Staphylococcus aureus* colonization of bovine teat tissue. *Journal of Dairy Research* 63:369-375.
- Fox LK, Hancock DD (1989). Effect of segregation on prevention of intramammary infections by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Dairy Science* 72:540-544.
- Fox LK, Nagy JA, Hillers JK, Cronrath JD, Ratkowsky DA (1991). Effects of postmilking teat treatment on the colonization of *Staphylococcus aureus* on chapped teat skin. *American Journal of Veterinary Research* 52:799-802.
- Fox LK, Norell RJ (1994). *Staphylococcus aureus* colonization of teat skin as affected by postmilking teat treatment when exposed to cold and windy conditions. *Journal of Dairy Science* 77:2281-2288.
- Francis PG (1984). Teat skin lesions and mastitis. *British Veterinary Journal* 140:430-436.
- Frank GH (1989). Pasteurellosis of cattle. In: C. Adlam, J.M. Rutter (eds) *Pasteurella and Pasteurellosis*. Academic Press, London, UK, pp. 197-222.
- Franz S, Hofmann-Parisot M, Gutler S, Baumgartner W (2003). Clinical and ultrasonographic findings in the mammary gland of sheep. *New Zealand Veterinary Journal* 51:238-243.
- Frederiksen W (1973). *Pasteurella* taxonomy and nomenclature. *Contributions to Microbiology and Immunology* 2(*Yersinia, Pasteurella and Francisella*):170-176.
- Frederiksen W (1993). Ecology and significance of Pasteurellaceae in man - an update. *Zentralblatt für Bakteriologie* 279:27-34.
- Fthenakis G (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 (1994). Prevalence and aetiology of subclinical mastitis in ewes of southern Greece. *Small Ruminant Research* 13:293-300.
- Fthenakis GC (1995). California Mastitis Test and Whiteside Test in diagnosis of subclinical mastitis in dairy ewes. *Small Ruminant Research* 16:271-276.
- Fthenakis GC (1996). Somatic cell counts in milk of Welsh-Mountain, Dorset-Horn and Chios ewes throughout lactation. *Small Ruminant Research* 20:155-162.
- Fthenakis GC, El-Masannat ETS, Booth JM, Jones JET (1991). Somatic cell counts of ewes' milk. *British veterinary Journal* 147:575-581.
- Fthenakis GC, Jones JET (1990α). The effect of experimentally induced subclinical mastitis on the milk yield of ewes and on the growth of lambs. *British veterinary Journal* 146:43-49.
- Fthenakis GC, Jones JET (1990β). The effect of inoculation of coagulase negative staphylococci into the ovine mammary gland. *Journal of comparative Pathology* 102:211-219.
- Fthenakis GC, Leontides L, Skoufos J, Taitzoglou IA, Tzora A (2004). Case report: high prevalence rate of ovine mastitis, caused by coagulase-negative staphylococci and predisposed by increased gossypol consumption. *Small Ruminant Research* 52:185-189.
- Fthenakis GC, Marples RR, Richardson JF, Jones JET (1994). Some properties of coagulase negative staphylococci isolated from cases of ovine mastitis. *Epidemiology and Infection* 112:171-176.
- Fthenakis GC, Papadopoulos E, Himonas C, Leontides L, Kritas S, Papatsas J (2000). Efficacy of moxidectin against sarcoptic mange and effects on milk yield of ewes and growth of lambs. *Veterinary Parasitology* 87:207-16.
- Fthenakis GC, Saratsis P, Tzora A, Linde K (1998). Naturally occurring subclinical ovine mastitis associated with *Listeria monocytogenes*. *Small Ruminant Research* 31:23-27.
- Gabler MT, Reneau JK, Farnsworth RJ (2001). Comparison of number of *Streptococcus uberis* calculated on a volume or weight basis in sand and sawdust bedding. *American Journal of veterinary Research* 62:171-173.
- Galli SJ, Dvorak AM, Dvorak HF (1984). Basophils and mast cells. Morphologic insights into their biology, secretory patterns and function. *Progress in Allergy* 34:1-141.
- Garcia ME, Duran C, Cruzado, Andrino M, Blanco JL (2004). Evaluation of molecular and immunological techniques for the diagnosis of mammary aspergillosis in ewes. *Veterinary Microbiology* 98:17-21.

- Gatewood DM, Fenwick BW, Chengappa MM (1994). Growth-condition dependent expression of *Pasteurella haemolytica* A1 outer membrane proteins, capsule, and leukotoxin. *Veterinary Microbiology* 141:221-233.
- Gennaro R, Dewald B, Horisberger U, Gubler HU, Baggiolini M (1983). A novel type of cytoplasmic granule in bovine neutrophils. *Journal of Cell Biology* 96:1651-1661.
- Gentry MJ, Confer AW, Weinberg ED, Homer JT (1986). Cytotoxin (leucotoxin) production by *Pasteurella haemolytica*: requirement for an iron-containing compound. *American Journal of veterinary Research* 47:1919-1923.
- Gilmour NJL, Gilmour JS (1989). Pasteurellosis of sheep. In: C Adlam, JM Rutter (eds): *Pasteurella and Pasteurellosis*. Academic Press, London, UK, pp. 223-262.
- Gogov I, Peeva T, Slavchev G (1984). Enterotoxic staphylococci in the milk of cows and sheep with mastitis. *Veterinarno-Meditsinski Nauki* 21:86-92.
- Gonzalez-Rodriguez MC, Carmenes-Diez P, Rodriguez MCG (1996). Evaluation of the California Mastitis Test as a discriminant method to detect subclinical mastitis in ewes. *Small Ruminant Research* 21:245-250.
- Gonzalo C, Baro JA, Carriedo JA, San Primitivo F (1993). Use of the Fossomatic method to determine somatic cell counts in sheep milk. *Journal of Dairy Science* 76:115-119.
- Gonzalo C, Carriedo JA, Baro JA, San Primitivo F (1994). Factors influencing variation of test day milk-yield, somatic-cell count, fat, and protein in dairy sheep. *Journal of Dairy Science* 77:1537-1542.
- Goodman RE, Schanbacher FL (1991). Bovine lactoferrin mRNA: sequence, analysis, and expression in the mammary gland. *Biochemical and biophysical Research Communications* 180:75-84.
- Gordon S, Todd J, Cohn ZA (1974). In vitro synthesis and secretions of lysozyme by mononuclear phagocytes. *Journal of experimental Medicine* 139:1228-1248.
- Gotze P, Meyer J, Buschmann H (1977). Studies on lysozyme concentration in blood and milk of healthy and udder-infection cows. *Zentralblatt fur Veterinarmedizin Reihe B* 24:560-568.
- Guidry AJ, Miller RH (1986). Immunoglobulin isotype concentration in milk as affected by stage of lactation and parity. *Journal of Dairy Science*. 69:1799-1805.
- Gunning RF, Bosworth PA (1989). Staphylococcal dermatitis involving the teats of lactating ewes. *The veterinary Record* 124:146-147.
- Gunning RF, Davies CH (1989). Isolation of *Pasteurella haemolytica* from teat lesions in ewes. *The veterinary Record* 125:490.

- Haig DM, Percival A, Mitchell J, Green I, Sargan D (1995). The survival and growth of ovine afferent lymph dendritic cells in culture depends on tumour necrosis factor- α and is enhanced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor but inhibited by interferon- γ . *Veterinary Immunology and Immunopathology* 45:221-236.
- Haig DM, Thomson J, McInnes C, McCaughan C, Imlach W, Mercer A, Fleming S (2002). Orf virus immuno-modulation and the host immune response. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 87:395-399.
- Hajtos J, Glavits R, Kovacs T, Palfi V, Makrai L (2000). Enzootic (staphylococcal) dermatitis in a Hungarian sheep flock. *Magyar Allatorvosok Lapja* 122:649-654.
- Hamann J (1985). Measurement of machine milking induced teat tissue reactions. *Milchwissenschaft* 40:16-18.
- Hamann J (1989). Factors for the genesis of bovine subclinical mastitis. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift* 102:342-346.
- Hamann J (1992). Stimulation and teat tissue reaction. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* 44:339-347.
- Hamann J, Burvenich C (1994). Physiological status of the bovine teat. *Bulletin of the international Dairy Federation* 297:3-12.
- HAMPL A, Jelinek P (1971). The lymphatic capillaries in the skin of cow teat. *Zentralblatt fur Veterinarmedizin Reihe A* 18:341-346.
- Harlan JM, Schwartz BR, Reidy MA, Schwartz SM, Ochs HD, Harker LA (1985). Activated neutrophils disrupt endothelial monolayer integrity by an oxygen radical-independent mechanism. *Laboratory Investigation* 52:141-150.
- Harmon RJ, Newbould FHS (1980). Neutrophil leukocyte as a source of lactoferrin in bovine milk. *American Journal of veterinary Research* 41:1603-1606.
- Harmon RJ, Schanbacher FL, Ferguson LC, Smith KL (1975). Concentration of lactoferrin in milk of normal lactating cows and changes occurring during mastitis. *American Journal of veterinary Research* 36:1001-1007.
- Hatziminaoglou J, Zervas N, Hatziminaoglou P, Sinapis E (1984). Suitability of Karagouniko ewes (Greece) for machine milking. Preliminary findings on milk yield and composition, morphology, and the kinetics of milk ejection. *Proceedings of the 3rd International Congress on Mechanical Milking of Small Ruminants*, Valladolid, Spain, pp. 607-624.
- Hemingway RG (1999). The influence of dietary selenium and vitamin E intakes on milk somatic cell counts and mastitis in cows. *Veterinary Research Communications* 23:481-499.

- Hemling TC (2002). Teat condition: prevention and cure through teat dips. *Proceedings of British Mastitis Conference*, Brockworth, UK, pp. 1-14.
- Henderson WR, Chi EY, Klebanoff SJ (1980). Eosinophil peroxidase-induced mast cell secretion. *Journal of experimental Medicine* 152:265-279.
- Hibbitt KG (1984). The structure and defence mechanisms of the bovine teat. *The veterinary Record* 115:170.
- Himmel ME, Yates MD, Lauerman LH, Squire PG (1982). Purification and partial characterization of a macrophage cytotoxin from *Pasteurella haemolytica*. *American Journal of veterinary Research* 43:764-7.
- Hogan JS, Duthie AH, Pankey JW (1986). Fatty-acid composition of bovine teat canal keratin. *Journal of Dairy Science*. 69:2424-2427.
- Honhold N, Carter ME (1987). *Pseudomonas aeruginosa* mastitis in a Sabi ewe. *The veterinary Record* 120:16.
- Horstick A, Hamann H, Distl O (2002). Estimation of genetic parameters for dairy milk percentage of east Friesian milk sheep by random regression models. *Proceedings of the 7th World Congress on Genetics applied to Livestock Production*, Montpellier, France, pp. 51-53.
- Hospes R, Seeh C (1998). Studies on theloressectoscopy in the bovine teat: an alternative to thelotomy and surgery. *Tierärztliche Umschau* 53:674-678.
- Hotzel I, Cheevers WP (2001). Host range of small-ruminant lentivirus cytopathic variants determined with a selectable caprine arthritis-encephalitis virus pseudotype system. *Journal of Virology* 75:7384-7391.
- Hotzel I, Cheevers WP (2002). A Maedi-Visna strain K1514 receptor gene is located in sheep chromosome 3p and the syntenic region of human chromosome 2. *Journal of general Virology* 83:1759-1764.
- Houwers DJ, Pekelder JJ, Akkermans JWPM, Van Der Molen EJ, Schreuder BE (1988). Incidence of indurative lymphocytic mastitis in a flock of sheep infected with Maedi-Visna virus. *The veterinary Record* 122:435-437.
- Howard CJ, Taylor G, Brownlie J (1980). Surface receptors for immunoglobulin on bovine polymorphonuclear neutrophils and macrophages. *Research in veterinary Science* 29:128-130.
- Hueston WD, Hartwig NR, Judy JK (1986). Patterns of non-clinical intra-mammary infection in a ewe flock. *Journal of the american veterinary medical Association* 188:170-172.

- Ingh TS van den, Visser IJ, Henricks PA, Binkhorst GJ (1990). Pulmonary lesions induced by a *Pasteurella haemolytica* cytotoxin preparation in calves. *Zentralblatt fur Veterinarmedizin Reihe B* 37:297-308.
- International Dairy Federation (1984). Recommended methods for somatic cell counting in milk. *Bulletin of the international Dairy Federation* 168.
- International Dairy Federation (1987). Machine milking and mastitis. *Bulletin of the international Dairy Federation* 215.
- International Dairy Federation (2003). *Ruminant Mammary Gland Immunology*. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
- Jacques YV, Bainton DF (1978). Changes in pH within the phagocytic vacuoles of human neutrophils and monocytes. *Laboratory Investigation* 39:179-185.
- Jain NC (1986). *Schalm's Veterinary Hematology*, 4th edn. Lea and Febiger, Philadelphia, USA.
- Jaramillo ML, Zenteno E, Trigo FJ (1999). Mechanisms of pathogenicity and adhesion in *Pasteurella haemolytica*. *Revista latinoamericana de Microbiologia* 41:105-116.
- Jensen R, Swift BL (1982). *Diseases of Sheep*, 2nd edn. Lea and Febiger, Philadelphia, USA.
- Jeyaseelan S, Kannan MS, Briggs RE, Thumbikat P, Maheswaran SK (2001). *Mannheimia haemolytica* leukotoxin activates a non-receptor tyrosine kinase signaling cascade in bovine leukocytes, which induces biological effects. *Infection and Immunity* 69:6131-6139.
- Johnston WS, MacLachlan GK, Murray IS (1980). A survey of sheep losses and their causes on commercial farms in the north Scotland. *The veterinary Record* 106:238-240.
- Jones GE (1983). Mycoplasmas of sheep and goats: a synopsis. *The veterinary Record* 113:619-620.
- Jones JET (1984). An investigation of mastitis in sheep in Cyprus (17.10.83-10.11.83). *Report to the Veterinary Department, Ministry of Agriculture, Republic of Cyprus*. Nicosia, Cyprus.
- Jones GE (1985). The pathogenicity of some ovine or caprine mycoplasmae in the lactating mammary gland of sheep and goats. *Journal of comparative Pathology* 95:305-318.
- Jones JET (1985). An investigation of mastitis in sheep: preliminary phase. *Proceedings of Meetings of the Sheep Veterinary Society* 10:48-50.
- Jones JET (1990). Mastitis in sheep: an epidemiological challenge. *Proceedings of 1st Congress of the Veterinary Association of Malaysia*, Kuala Lumpur, Malaysia, pp. 38-41.
- Jones JET (1991). Mastitis. In: WB Martin, ID Aitken (eds) *Diseases of Sheep*, 2nd edn. Blackwell, Oxford, pp. 75-78.

- Jones TO, Turnbull PCB (1981). Bovine mastitis caused by *Bacillus cereus*. *The veterinary Record* 108:272-274.
- Jones JET, Watkins GH (2001) In: WB Martin, ID Aitken (eds) *Diseases of Sheep*, 3rd edn. Blackwell, Oxford, pp. 75-80.
- Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N (1985). *Pathology of Domestic Animals*, 2nd edn. Academic Press, London.
- Katitch R, Youkitchevitch Z, Jovanovitch R, Militch D (1968). The possibility of simultaneous vaccination against gangrenous mastitis and enterotoxamias in sheep. *Bulletin de l' Office internationale des Epizooties* 70:693-699.
- Keisler DH, Andrews ML, Moffat RJ (1992). Subclinical mastitis in ewes and its effects on lamb performance. *Journal of animal Science* 70:1677-1681.
- Kirk JH, Glenn JS (1996). Mastitis in ewes. *Compendium on continuing Education for the practicing Veterinarian* 18:582-591.
- Kirk JH, Huffman EM, Anderson BC (1980). Mastitis and udder abnormalities as related to neonatal lamb mortality in shed-lambing ewes. *Journal of animal Science* 50:610-616.
- Kitching RP (2001) Sheep pox. In: WB Martin, ID Aitken (eds) *Diseases of Sheep*, 3rd edn. Blackwell, Oxford. pp. 266-270.
- Klebanoff SJ (1970). *Biochemistry of the Phagolytic Process*. North Holland Publishing Company, London.
- Koukoulis A, Sofia M, Deligiannis C, Psychas V, Lainas T, Spyrou V, Goulas P, Billinis C (2005). Maedi-Visna eradication in a flock of purebred Karagouniko sheep: results of an ongoing study. *Proceedings of 6th International Sheep Veterinary Congress*, Hersonissos, Greece, pp. 207-208.
- Kraft R, Bachmann M, Bachmann K, Buerki H, Hess MW, Cottier H, Stoner RD (1987). Satisfactory primary tetanus antitoxin responses but markedly reduced germinal center formation in 1st draining lymph nodes of aging mice. *Clinical and experimental Immunology* 67:447-453.
- Kumar D, Gupta PP, Rana JS, Banga HS (1993). Pathology of *Mycoplasma* serogroup 11 induced mastitis in sheep. *Australian veterinary Journal* 70:70-81.
- Las Heras A, Dominguez L, Fernandez-Garayzabal JF (1999). Prevalence and aetiology of subclinical mastitis in dairy ewes of the Madrid region. *Small Ruminant Research* 32:21-29.

- Las Heras A, Dominguez L, Lopez I, Fernandez-Garayzábal JF (1999). Outbreak of acute ovine mastitis associated with *Pseudomonas aeruginosa* infection. *The veterinary Record* 145:111-112.
- Las Heras A, Dominguez L, Lopez I, Paya MJ, Pena L, Mazzucchelli F, Garcia LA, Fernandez-Garayzabal JF (2000). Intramammary *Aspergillus fumigatus* infection in dairy ewes associated with antibiotic dry therapy. *The veterinary Record* 147:578-580.
- Las Heras A, Vela AI, Fernandez E, Legaz E, Dominguez L, Fernandez-Garayzabal F (2001). Unusual outbreak of clinical mastitis in dairy sheep caused by *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *Journal of clinical Microbiology* 40:1106-1108.
- Lafi SQ, Hailat NQ (1998). Bovine and ovine mastitis in Dhuleil Valley of Jordan. *Veterinarski Arhiv* 68:51-57.
- Lafleur RL, Abrahamsen MS, Maheswaran SK (1998). The biphasic mRNA expression pattern of bovine interleukin-8 in *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharide-stimulated alveolar macrophages is primarily due to tumor necrosis factor alpha. *Infection and Immunity* 66:4087-4092.
- Lafleur RL, Malazdrewich C, Jeyaseelan S, Bleifield E, Abrahamsen MS, Maheswaran SK (2001). Lipopolysaccharide enhances cytolysis and inflammatory cytokine induction in bovine alveolar macrophages exposed to *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica* leukotoxin. *Microbial Pathogenesis* 30:347-357.
- Lagriffoul G, Bergonier D, Berthelot X, Jacquin M, Guillouet P, Barillet F (1996). Genetic and non-genetic factors of variation of somatic cell counts in the milk of ewes. *Proceedings of the International Symposium on Somatic Cells and Milk of Small Ruminants*, Bella, Italy, pp. 149-155.
- Lainson FA, Harkins DC, Wilson CF, Sutherland AD, Murray JE, Donachie W, Baird GD (1991). Identification and localization of an iron-regulated 35 kDa protein of *Pasteurella haemolytica* serotype A2. *Journal of general Microbiology* 137:219-226.
- Lainson FA, Thomson N, Rowe HA, Langford PR, Aitchison KD, Donachie W, Kroll JS (1996). Occurrence of [copper, zinc]-cofactored superoxide dismutase in *Pasteurella haemolytica* and its serotype distribution. *FEMS Microbiology Letters* 142:11-17.
- Landau M, Tamarin R (1974). Ovine mastitis research, 1963-1973 - A review. *Refuah Veterinarith* 31:134-147.
- Larsgard AG, Vaabenoe A (1993). Genetic and environmental causes of variation in mastitis in sheep. *Small Ruminant Research* 12:339-347.

- Laws L, Elder JK (1969). Mastitis in sheep caused by *Actinobacillus lignieresii*. *Australian veterinary Journal* 45:401-403.
- Lee CS, Lascelles AK (1969). Distribution of lymphatic vessels in mammary glands of ewes. *American Journal of Anatomy* 126:489-495.
- Lee CS, Lascelles AK (1970α). Antibody-producing cells in antigenically stimulated mammary glands and in the gastro-intestinal tract of sheep. *Australian Journal of experimental Biology and medical Sciences* 48:525-535.
- Lee CS, Lascelles AK (1970β). Histological changes in involuting mammary glands of ewes in relation to local allergic response. *Journal of reproductive Fertility* 21:373-375.
- Lefcourt AM (1982). Rhythmic contractions of the teat sphincter in bovines: an expulsion mechanism. *American Journal of Physiology* 242:181-184.
- Leitner G, Chaffer M, Caraso Y Ezra, Kababea D, Winkler M, Glickman A, Saran A (2003). Udder infection and milk somatic cell count, NAGase activity and milk composition-fat protein and lactose-in Israeli-Assaf and Awassi sheep. *Small Ruminant Research* 49:157-164.
- Leitner G, Chaffer M, Shamay A, Shapiro F, Merin U, Ezra E, Saran A, Silanikove N (2004). Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in sheep. *Journal of Dairy Science* 87:46-52.
- Leitner G, Chaffer M, Zamir S, Mor T, Glickman A, Winkler M, Weisblit L, Saran A (2001). Udder diseases etiology, milk somatic cell counts and NAGase activity in Israeli Assaf sheep throughout lactation. *Small Ruminant Research* 39:107-112.
- Leyshon WJ (1929). An examination of a number of cases of ovine mastitis. *Veterinary Journal* 85:286-300 & 331-344.
- Lie O, Syed M, Solbu H (1986). Improved agar plat assays of bovine lysozyme and haemolytic complement activity. *Acta veterinaria scandinavica* 27:23-32.
- Ligda C, Mavrogenis A, Georgoudis A (2002). Estimate of genetic parameters for somatic cell counts in Chios dairy sheep. *Proceedings of 7th World Congress on Genetics applied to Livestock Production*, Montpellier, France, pp. 19-21.
- Linde K, Holmberg O, Astrom G (1980). The interference between coagulase negative staphylococci and *Corynebacterium bovis* and the common udder pathogens in the lactating cow. *Nordisk veterinaer Medicin* 32:552-558.
- Linzell JL (1952). The silver staining of the myoepithelial cells, particularly in the mammary gland, and the relation to the ejection of the milk. *Journal of Anatomy* 86:49-57.

- Linzell JL (1971). Mammary blood vessels, lymphatic and nerves. In: IR Falconer (ed) *Lactation*. Butterworths, London, UK, pp. 41-50.
- Lo RY, McKerral LJ, Hills TL, Kostrzynska M (2001). Analysis of the capsule biosynthetic locus of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* A1 and proposal of a nomenclature system. *Infection and Immunity* 69:4458-4464.
- Lorenz RG, Chaplin DD, McDonald KG, McDonough JS, Newberry RD (2003). Isolated lymphoid follicle formation is inducible and dependent upon lymphotoxin-sufficient B lymphocytes, lymphotoxin β -receptor, and TNF receptor I function. *Journal of Immunology* 170:5475-5482.
- Lujan L, Marin JFG, De Luco F, Vargas A, Badiola JJ (1991). Pathological changes in the lungs and mammary glands of sheep and their relationship with Maedi-Visna infection. *The veterinary Record* 129:51-54.
- Lydyard PM, Rossi CE (2001). Cells, tissues and organs of the immune system. In: I Roitt, J Brostoff, D Male (eds) *Immunology*, 6th edn. Mosby, Philadelphia, USA, pp. 15-44.
- MacDougall S, Voermans M (2002). Influence of estrus on somatic cell count in dairy goats. *Journal of Dairy Science* 85:378-383.
- McCarthy FD, Lyndsey JB, Gore MT, Notter DR (1988). Incidence and control of subclinical mastitis in the intensively managed ewes. *Journal of animal Science* 66:2715-2721.
- McDougall S, Murdough P, Pankey W, Delaney C, Barlow J, Scruton D (2001). Relationships among somatic cell counts, California Mastitis Test, impedance and bacteriological status of milk in goats and sheep in early lactation. *Small Ruminant Research* 40:245-254.
- McDougall S, Pankey W, Delaney C, Barlow J, Patricia A. Murdough, Scruton D (2002). Prevalence and incidence of subclinical mastitis in goats and dairy ewes in Vermont, USA. *Small Ruminant Research* 46:115-121.
- McDowell LR, Williams SN, Hidioglou N, Njeru CA, Hill GM, Ochoa L, Wilkinson NS (1996). Vitamin E supplementation for the ruminant. *Animal Feed Science and Technology* 60:273-296.
- Mackie DP, Rodgers SP (1986). Mastitis and cell content in milk from Scottish blackface ewes. *The veterinary Record* 118:20-21.
- Madanat A, Zendulkova D, Pospischil Z (2001). Contagious agalactia of sheep and goats. A review. *Acta veterinaria Brno* 70:403-412.
- Madel AJ (1981). Observations on the mammary glands of culled ewes at the time of slaughter. *The veterinary Record* 109:362-363.

- Maheswaran SK, Weiss DJ, Kannan MS, Townsend EL, Reddy KR, Whiteley LO, Srikumaran S (1992). Effects of *Pasteurella haemolytica* A1 leukotoxin on bovine neutrophils: degranulation and generation of oxygen-derived free radicals. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 33:51-68.
- Maisi P, Seppanen J, Juntilla J (1987). Detection of subclinical mastitis in ewes. *British veterinary Journal* 143:402-409.
- Mallard BA, Dekkers JC, Ireland MJ, Leslie KE, Sharif S, Van Kampen C, Wagter L, Wilkie BN (1998). Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cows and calf health. *Journal of Dairy Science* 81:585-595.
- Mandal PC, Sharma DR, Ahuja SP (1977). Observations on a spontaneous case of fatal ovine mastitis due to *Klebsiella pneumoniae*. *Zentralblatt fur Veterinarmedizin Reihe B* 24:168-174.
- Marco Melero JC (1994). *Mastitis in Laxta Breed Sheep: Epidemiology, Diagnosis and Control*. Doctoral thesis, University of Zaragoza.
- Margetin M, Capistrak A, Kica J, Valkovsky P, Foltys V (1993). Somatic cell count, production and milk composition in sheep to weaning of lambs and after it. *Proceedings of the International Symposium on Somatic Cells and Milk of Small Ruminants*, Bella, Italy, pp. 199-202.
- Margetin M, Capistrak A, Spanik J, Foltys V (1996). Somatic cells in sheep milk in relation to milk production and composition during sucking and milking. *Zivocisna Vyroba* 41:543-550.
- Marsh H (1932). Mastitis in ewes caused by infection with a pasteurella. *Journal of the american veterinary Medical Association* 81:376-382.
- Martin WB (2001) Pyodermas. In: WB Martin, ID Aitken (eds) *Diseases of Sheep*, 3rd edn, Blackwell, Oxford, pp. 274-276.
- Masson PL, Heremans JF, Dive CH (1966). An iron-binding protein common to many external secretions. *Clinica chemica Acta* 14:735-739.
- Mavrogenis AP, Koumas A, Kakoyiannis CK, Taliotis C (1995). Use of somatic cell counts for the detection of subclinical mastitis in sheep. *Small Ruminant Research* 17:79-84.
- Mavrogianni VS, Fthenakis GC, Burriel AR, Gouletsou P, Papaioannou N, Taitzoglou IA (2004). Experimentally induced teat stenosis in dairy ewes: clinical, pathological and ultrasonographic features. *Journal of comparative Pathology* 13:70-74.
- May NDS (1970). *The Anatomy of the Sheep*. University of Queensland Press, Melbourne, Australia.
- Mayer SJ, Craven N, Keen PM, Bourne JF (1988). Effect of pH changes on the killing of

- Staphylococcus aureus* and other mastitis pathogens by bovine neutrophil granule extracts. *Research in veterinary Science* 44:324-328.
- Mehrzaad J, Dosogne H, Vangroenweghe F, Burvenich C (2001). A comparative study of bovine blood and milk neutrophil functions with luminol-dependent chemiluminescence. *Luminescence* 16:343-356.
- Menzies P (2000). Mastitis of sheep-overview of recent literature. *Proceedings of the 6th Great Lakes Sheep Symposium*, Guelph, Canada, pp. 60-68.
- Menzies PI, Ramanoon SZ (2001). Mastitis of sheep and goats. *The veterinary Clinics of north America - Food Animal Practice* 17:333-357.
- Mepham TB (1983). Physiological aspects of lactation. In: TB Mepham (ed.) *Biochemistry of Lactation*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, pp. 3-28.
- Miles AA, Misra SS (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *Journal of Hygiene (Cambridge)* 38:732-749.
- Mill AB, Campbell KL (1992). Concurrent hypothyroidism, IgM deficiency, impaired T-cell mitogen response and multifocal cutaneous squamous papillomas in a dog. *Canine Practice* 17:5-21.
- Mimms CA (1987). *The Pathogenesis of Infectious Diseases*, 3rd edn. Academic Press, London, UK.
- Minett FC (1939). Prevention of ovine mastitis by the use of staphylococcus toxoid. *Journal of comparative Pathology and Therapeutics* 52:167-182.
- Monks J, Geske FJ, Lehman L, Fadok VA (2002). Do inflammatory cells participate in mammary gland involution? *Journal of Mammary Gland Biology* 7:163-176.
- Monteiro-Riviere NA, Stinson AW, Calhoun HL (1993). Integument. In: Dellmann HD (ed.) *Textbook of Veterinary Histology*, 4th edn. Lea & Febiger, Philadelphia, USA, pp. 285-288.
- Morck DW, Ellis BD, Domingue PA, Olson ME, Costerton JW (1991). In vivo expression of iron regulated outer-membrane proteins in *Pasteurella haemolytica*-A1. *Microbial Pathogenesis* 11:373-378.
- Morck DW, Olson ME, Acres SD, Daoust PY, Costerton JW (1989). Presence of bacterial glycocalyx and fimbriae on *Pasteurella haemolytica* in feedlot cattle with pneumonic pasteurellosis. *Canadian Journal of veterinary Research* 53:167-71.
- Morgante M, Beghelli D, Pauselli M, Dall' Ara P, Capuccella M, Ranucci S (1999). Effect of administration of vitamin E and selenium during the dry period on mammary health and milk cell counts in dairy ewes. *Journal of Dairy Science* 82:623-631.

- Morgante M, Ranucci S, Pauselli M, Beghelli D, Mencaroni G (1996). Total and differential cell counts in milk of primiparous Comisana ewes without clinical signs of mastitis. *Small Ruminant Research* 21:265-271.
- Moroni P, Cuccuru C (2001). Relationship between mammary gland infections and some milk immune parameters in Sardinian breed ewes. *Small Ruminant Research* 41:1-7.
- Moyron-Quiroz JE, Rangel-Moreno J, Kusser K, Hartson L, Sprague F, Goodrich S, Woodland DL, Lund FE, Randall TD (2004). Role of inducible bronchus associated lymphoid tissue (iBALT) in respiratory immunity. *Nature Medicine* 10:927-934.
- Mura D, Altieri M (1950). Aetiology, pathogenesis and prophylaxis in gangrenous mastitis of sheep and goats. *Zooprofilassi* 5:449-465.
- Nardini PM, Mellors A, Lo RY (1998). Characterization of a fourth lipoprotein from *Pasteurella haemolytica* A1 and its homology to the OmpA family of outer membrane proteins. *FEMS Microbiology Letters* 165:71-77.
- Neijenhuis F, Barkema HW, Hogeveen H, Noordhuizen JPTM (2001). Relationship between teat-end callosity and occurrence of clinical mastitis. *Journal of Dairy Science* 84:2664-2672.
- Newberry RD, Lorenz RG (2005). Organizing a mucosal defense. *Immunology Reviews* 206:6-21.
- Newbould FH (1973). The effect of added serum and glucose and some inherent factors, on phagocytosis in vitro by milk leukocytes from several cows. *Canadian Journal of comparative Medicine* 37:189-194.
- Nickerson SC (1987). Resistance mechanisms of the bovine udder: new implications for mastitis at the teat end. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 191:1484-1488.
- Nickerson SC, Pankey JW (1983). Cytolytic observations of the bovine teat end. *American Journal of Veterinary Research* 44:1433-1441.
- Niemialtowski M, Nonnecke BJ, Targowski SP (1988). Phagocytic activity of milk leukocytes during chronic staphylococcal mastitis *Journal of Dairy Science* 71:768-787.
- Noble WC, Somerville DA (1974). Skin as a habitat. In: WC Noble (ed.) *Microbiology of Human Skin*. Saunders, Philadelphia, USA, pp. 3-78.
- Nocard ME (1887). A note on the gangrenous mastitis of dairy ewes. *Annals de l' Institut Pasteur de Paris* 1:417-428.
- Norcross NL (1991). Specific defence mechanisms of the udder. *Flemish veterinary Journal* 62(Suppl. 1):129-139.

- O'Brien PM, Campo MS (2002). Evasion of host immunity directed by papillomavirus encoded proteins. *Virus Research* 8:103-117.
- O'Brien JK, Duffus WP (1989). *Pasteurella haemolytica* cytotoxin: relative susceptibility of bovine leucocytes. *Veterinary Microbiology* 13:321-334.
- Olechnowicz J, Jaskowski JM (2003). Condition, reproductive disorders and milk production in cows. *Medycyna Weterynaryjna* 61:972-975.
- Oliver SP, Sordillo LM (1989). Approaches to the manipulation of mammary involution. *Journal of Dairy Science* 72:1647-1664.
- Oltenu PA, Bendixen PH, Vilson B, Ekesbo I (1990). Tramped teats-clinical mastitis disease complex in tied cows. Environmental risk factors and interrelationships with other diseases. *Acta veterinaria scandinavica* 31:471-478.
- Onash H, Healy AM, Brophy PO, Kinsella A, Doherty ML (2003). A study of mastitis in sheep, *Proceedings of Meetings of the Sheep Veterinary Society* 27:49-50.
- Orphanou E (1987). *Post Weaning Mastitis in Ewes: a Clinical and Bacteriological Investigation*. Project report, MSc in Medical Microbiology, London School of Hygiene and Tropical Medicine, University of London.
- Osterlundh I, Holst H, Magnusson U (1998). Hormonal and immunological changes in blood and mammary secretion in the sow at parturition. *Theriogenology* 50:465-477.
- Othmane MH, Carriedo JA, De La Fuente LF, San Primitivo F (2002). Factors affecting test-day milk composition in dairy ewes, and relationships amongst various milk components. *Journal of Dairy Science* 69:53-62.
- Outteridge PM, Lascelles AK. (1966). The cellular and immune response in milk and regional lymph during experimental mastitis. *Research in veterinary Science* 7:360-367.
- Outteridge PM, Lee CS (1981). Cellular immunity in the mammary gland with particular reference to T, B lymphocytes and macrophages. *Advances in experimental Medicine and Biology* 137:513-534.
- Paape MJ, Bannerman DD, Zhao X, Lee JW (2003). The bovine neutrophil: structure and function in blood and milk. *Veterinary Research* 34:597-627.
- Paape MJ, Guidry AJ (1977). Effect of fat and casein on intracellular killing of *Staphylococcus aureus* by milk leukocytes *Proceedings of Meetings of the Society for experimental Biology and Medicine* 155:588-593.

- Paape MJ, Guidry AJ, Kirk ST, Bolt DJ (1975). Measurement of phagocytosis of ³²P-labeled *Staphylococcus aureus* by bovine leukocytes: lysostaphin digestion and inhibitory effect of cream. *American Journal of veterinary Research* 36:1737-1743.
- Paape MJ, Miller RH, Ziv G (1991). Pharmacologic enhancement or suppression of phagocytosis by bovine neutrophils. *American Journal of veterinary Research* 52:363-366.
- Paape MJ, Schultze WD, Desjardins C, Miller RH (1974). Plasma corticosteroid, circulating leukocytes and milk somatic cell responses to *Escherichia coli* endotoxin-induced mastitis. *Proceedings of the Society for experimental Biology and Medicine* 145:553-559.
- Paape MJ, Schultze WD, Guidry AJ (1985). Development of natural defense mechanisms. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* 37:447-457.
- Paape MJ, Wergin WP (1977). The leukocyte as a defense mechanism. *Journal of the american veterinary medicine Association* 170:1214-1223.
- Paape MJ, Wergin WP, Guidry AJ, Pearson RE (1979). Leukocyte: second line of defense against invading mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science* 62:135-153.
- Palfi V, Glavits R (1996). Interstitial mastitis in Maedi-Visna virus infected ewes. *Magyar Allatorvosok Lapja* 51:586-589.
- Pandher K, Murphy GL (1996). Genetic and immunological analyses of a 38 kDa surface-exposed lipoprotein of *Pasteurella haemolytica* A1. *Veterinary Microbiology* 51:331-341.
- Pandher K, Murphy GL, Confer AW (1999). Identification of immunogenic, surface-exposed outer membrane proteins of *Pasteurella haemolytica* serotype 1. *Veterinary Microbiology*. 65:215-226.
- Pankey JW, Eberhart RJ, Cumming AL, Daggett RJ, Farnsworth RJ, McDuff CK (1984). Uptake of postmilking teat antisepsis. *Journal of Dairy Science* 67:1336-1353.
- Pankey JW, Wildman EE, Dreschler PA, Hogan JS (1987). Field trial evaluation of premilking teat disinfection. *Journal of Dairy Science* 70:867-872.
- Papadopoulos O, Leontides S (1972). Mastitis produced experimentally in sheep with an ovine abortion Chlamydia. *Zentralblatt fur Veterinarmedizin Reihe B* 19:655-665.
- Paulsen DB, Confer AW, Clinkenbeard KD, Mosier DA (1990). *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharide-induced arachidonic acid release from and neutrophil adherence to bovine pulmonary artery endothelial cells. *American Journal of veterinary Research* 51:1635-1639.
- Paulsen DB, Mosier DA, Clinkenbeard KD, Confer AW (1989). Direct effects of *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharide on bovine pulmonary endothelial cells in vitro. *American Journal of veterinary Research* 50:1633-1637.

- Pegreff G (1963). Mastitis in sheep and goats. *Bulletin de l' Office international des Epizooties* 60:1009-1040.
- Pekelder JJ, Veenink GJ, Akkermans JPWM, Van Eldik P, Elving L, Houwers DJ (1994). Ovine lentivirus induced indurative lymphocytic mastitis and its effect on the growth of lambs. *The veterinary Record* 134:348-350.
- Pengov A (2001). The role of coagulase-negative *Staphylococcus* spp. and associated somatic cell counts in the ovine mammary gland. *Journal of Dairy Science* 84:572-574.
- Pepin M, Vitu C, Russo P, Mornex JF, Peterhans E (1998). Maedi-Visna virus infection in sheep: a review. *Veterinary Research* 29:341-367.
- Perez V, Corpa JM, Marin JFG, Aduriz JJ, Jensen HE (1998). Mammary and systemic aspergillosis in dairy sheep. *Veterinary Pathology* 35:235-240.
- Peris C, Molina P, Fernandez N, Rodriguez M, Torres A (1991). Variation in somatic cell counts, California mastitis test and electrical conductivity among various fractions of ewe's milk. *Journal of Dairy Science* 74:1553-1560.
- Persson K (1992). *Studies on Inflammation in the Bovine Teat*. Ph.D. Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences.
- Persson K, Colditz IG, Flapper P, Franklin NAF, Seow HF (1996). Cytokine-induced inflammation in the ovine teat and udder. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 53:73-85.
- Persson K, Larsson I, Sandgren CH (1993). Effects of certain inflammatory mediators on bovine neutrophil migration in vivo and in vitro. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 37:99-112.
- Petrovski KR (2005). An acute outbreak of teat lesions affecting 38% of a dairy herd in Northland. *New Zealand veterinary Journal* 53:162-163.
- Plant J (2001) Bacterial and fungal infections of the skin and wool. In: WB Martin, ID Aitken (eds) *Diseases of Sheep*, 3rd edn. Blackwell, Oxford, UK, pp. 276-280.
- Plommet M (1960). Staphylococcal mastitis in sheep. Experimental infection. *Annales de l' Institut Pasteur de Paris* 98:439-455.
- Politis I, McBride BW, Burton JH, Zhao X, Turner JD (1991) Secretion of interleukin-1 by bovine milk macrophages. *American Journal of veterinary Research* 52:858-862.
- Politis I, Zhao X, McBride BW, Burton JH (1992) Function of bovine mammary macrophages as antigen-presenting cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 30:399-410.
- Potter AA, Ready K, Gilchrist J (1988). Purification of fimbriae from *Pasteurella haemolytica* A-1. *Microbial Pathogenesis* 4:311-316.

- Potter AA, Schryvers AB, Ogunnariwo JA, Hutchins WA, Lo RY, Watts T (1999). Protective capacity of the *Pasteurella haemolytica* transferrin-binding proteins TbpA and TbpB in cattle. *Microbial Pathogenesis* 27:197-206
- Pyorala S (2003). Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Veterinary Research* 34:565-578.
- Quinlivan TD (1968). Survey observations on ovine mastitis in New Zealand stud Romney flocks.1. The incidence of ovine mastitis. *New Zealand veterinary Journal* 16:149-153.
- Quinlivan TD (1972). Ovine mastitis. *Proceedings of the 2nd Seminar of the New Zealand Veterinary Association Sheep and Beef Cattle Society*, Palmerston North, New Zealand, pp. 33-40.
- Quinney S, Davison N, Bebbington T (2003). Severe teat lesions in a sheep flock. *The veterinary Record* 152:696.
- Raab W (1990). Skin cleansing in health and disease. *Wiener Medizinische Wochenschrift* 17(Suppl. 108):4.
- Radostits OM, Blood DC, Gay CC (2000). *Veterinary Medicine: a Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses*. Saunders, Philadelphia, USA.
- Rainard P (2003). The complement in milk and defense of the bovine mammary gland against infections. *Veterinary Research* 34:647-670.
- Rainard P, Poutrel B (1995). Deposition of complement components on *Streptococcus agalactiae* in bovine milk in the absence of inflammation. *Infection and Immunity* 63:3422-3427.
- Rainard P, Poutrel B (2000). Generation of complement fragment C5a in milk is variable among cows. *Journal of Dairy Science* 83:945-951.
- Ranucci S, Morgante M (1993). Sanitary control of the sheep udder: total and differential cell counts in milk. *Proceedings of the International Symposium on Somatic Cells and Milk of Small Ruminants*, Bella, Italy, pp.5-13.
- Rapoport E, Visinsky Y, Hanoch U, Faingolg D, Shani A, Hatib N, Kussak A (1999). Outbreaks of acute ovine mastitis caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the 6th Symposium on the Milk of Small Ruminant Milking and Milk Production of Dairy Sheep and Goats*, Athens, Greece, pp. 192-195.

- Rashid J, Weiss DJ, Maheswaran SK, Murtaugh MP (1996). In vitro expression and inhibition of procoagulant activity produced by bovine alveolar macrophages and peripheral blood cells. *Veterinary Research Communications* 20:519-31.
- Rausch PG, Moore TG (1975). Granule enzymes of polymorphonuclear neutrophils: a phylogenetic comparison. *Blood* 46:913-919.
- Regi G, Honegger R, Buchi S, Segessemann V, Rusch P (1991). Cell count and Schalm test results of milk from dairy sheep with healthy udders during the course of a complete lactation. *Schweizerische Tierheilkunde* 133:75-80.
- Reid HW (1991). Orf. In: Martin WB, Aitken ID (eds) *Diseases of Sheep*, 2nd edn. Blackwell, Oxford, UK, pp. 265-269.
- Reid HW (2001) Orf. In: WB Martin, ID Aitken (eds) *Diseases of Sheep*, 3rd edn. Blackwell, Oxford, UK, pp. 191-198.
- Reif MH, Field T, Diego M (2001). Differential sucking by neonates of depressed versus non-depressed mothers. *Infant Behaviour and Development* 27:465-476.
- Reiter B (1985). Protective proteins in milk - Biological significance and exploitation. *Bulletin of the international Dairy Federation* 191.
- Roberts DS (1956). A new pathogen from a ewe with mastitis. *Australian veterinary Journal* 32:330-332.
- Romalde JL, Magarinos B (1997). Immunization with bacterial antigens: pasteurellosis. *Developments in biological Standardization* 90:167-177.
- Romeo M, Esnal A, Contreras A, Aduriz JJ, Gonzalez L, Marco JC (1996). Evolution of milk somatic cell counts along the lactation period in sheep of the Laxta breed. *Proceedings of the International Symposium on Somatic Cells and Milk of Small Ruminants*, Bella, Italy, pp. 21-25.
- Romeo M, Ziluga I, Marco J (1998). Field diagnosis of mammary infection by means of palpation and California mastitis test and its association with somatic cell counts. *Ovis* 59:61-77.
- Ronchi B, Lacetera NG, Bernabucci U, Nardone A (1996). Preliminary report on the relations between selenium status and milk somatic cell count in the selenium deficient Sardinian ewes. *Proceedings of the International Symposium on Somatic Cells and Milk of Small Ruminants*, Bella, Italy, pp. 137-171.
- Ruffo G, Sangiorgio F (1978). Development of devices for cleaning teatcup clusters after each milking. *Proceedings of the International Symposium on Machine Milking (17th Annual Meeting of the National Mastitis Council)*, Louisville, USA, pp. 388-399.

- Saad AM, Ostensson K (1990). Flow cytometric studies on the alteration of leukocyte populations in blood and milk during endotoxin-induced mastitis in cows. *American Journal of Veterinary Research* 51:1603-1607.
- Saloniemi H, Roine K (1981). Field observations on the incidence of bovine clinical mastitis and teat diseases. *World Veterinarian* 43:297-305.
- Sanchis R, Abadie G, Lambert M, Cabasse E, Dufour P, Guibert JM, Pepin M (2000). Inoculation of lactating ewes by the intramammary route with *Mycoplasma agalactiae*: comparative pathogenicity of six field strains. *Veterinary Research* 31:329-337.
- Sandgren CH (1991). *The Neutrophil in the Bovine Udder, Friend or Foe? Studies of Bovine Neutrophil Function in Blood, Milk and Teat Secretions*. Ph.D. thesis, Swedish University of Agricultural Sciences.
- Saratsis P, Alexopoulos C, Tzora A, Fthenakis GC (1999). The effect of experimentally induced subclinical mastitis on the milk yield of dairy ewes. *Small Ruminant Research* 32: 205-209.
- Saratsis P, Leontides L, Tzora A, Alexopoulos C, Fthenakis GC (1998). Incidence risk and aetiology of mammary abnormalities in dry ewes in 10 flocks in southern Greece. *Preventive Veterinary Medicine* 37:173-183.
- Savoini A, Marzari R, Dolzani L, Serrano D, Graziosi G, Gennaro R, Romeo D (1984). Wide-spectrum antibiotic activity of bovine granulocyte polypeptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 26:405-407.
- Schalm OW, Carrol EJ, Jain NC (1971). *Bovine Mastitis*. Lea & Febiger, Philadelphia, USA.
- Schanbacher FL, Goodman RE, Talhouk RS (1993). Bovine mammary lactoferrin: implications from messenger ribonucleic acid (mRNA) sequence and regulation contrary to other milk proteins. *Journal of Dairy Science* 76:3812-3831.
- Schijns VECJ, Horzinek MC (1997). *Cytokines in Veterinary Medicine*. CAB International, Oxford, UK.
- Schoder D, Winter P, Kareem A, Baumgartner W, Wagner M (2003). A case of sporadic ovine mastitis caused by *Listeria monocytogenes* and its effect on contamination of raw milk and raw-milk cheeses produced in the on-farm dairy. *Journal of Dairy Research* 70:395-401.
- Schummer A, Wilkens H, Vollmerhaus B, Habermehl KH (1981). The circulatory system, the skin and the cutaneous organs of the domestic mammals. In: R Nickel, A Schummer, E Seiferle (eds) *The Anatomy of the Domestic Animals*, vol. 3. Paul Parey, Berlin, Germany, vol. 3, pp. 468-524.

- Scott MJ, Jones JET (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.
- Scott PR, Murphy S (1997). Outbreaks of staphylococcal dermatitis in housed lactating Suffolk ewes. *The veterinary Record* 140:631-632.
- Sears PM, Gonzalez RN, Wilson DJ, Han HR (1993). Procedures for mastitis diagnosis and control. *The veterinary Clinics of north America - Food Animal Practice* 9:445-468.
- Seeh C, Melle T, Medl M, Hospes R (1998). Systematic classification of milk flow obstruction in cattle using endoscopic findings with special consideration of hidden teat injuries. *Tierärztliche Praxis Ausgabe Grosstiere Nutztiere* 26:174-86.
- Senft B, Meyer F, Hartmann ML (1980). The importance of proteins of teat canal keratin as complex defense system of bovine mammary gland. *Milchwissenschaft* 45:295-298.
- Serrano M, Perez-Guzman MD, Montoro V, Jurado JJ (2003). Genetic analysis of somatic cell count and milk traits in Manchega ewes-Mean lactation and test-day approaches. *Livestock Production Science* 84:1-10.
- Sevi A, Albenzio M, Marino R, Santillo A, Muscio A (2004). Effects of lambing season and stage of lactation on ewe milk quality. *Small Ruminant Research* 51:251-259.
- Sevi A, Albenzio M, Muscio A, Casamissima D, Centoducati P (2003). Effects of litter management on airborne particulates in sheep houses and on the yield and quality of ewe milk. *Livestock Production Science* 81:1-9.
- Sevi A, Massa S, Annicchiarico G, Dell'Aquila S, Muscio A (1999). Effect on stocking density on ewe's milk yield, udder health and microenvironment. *Journal of Dairy Research* 66:489-499.
- Sevi A, Taibi L, Albenzio M, Annicchiarico G, Muscio A (2001). Airspace effects on the yield and quality of ewe milk. *Journal of Dairy Science* 84:2632-2640.
- Sevi A, Taibi L, Albenzio M, Muscio A, Annicchiarico G (2000). Effect of parity on milk yield, composition, somatic cell count, renneting parameters and bacteria counts of Comisana ewes. *Small Ruminant Research* 37:99-107.
- Sevi A, Taibi L, Muscio A, Dell'Aquila S, Casamassima D (1998). Quality of milk as affected by number of lambs and length of suckling. *Italian Journal of Food Science* 3:229-241.
- Shahani KM, Herper WJ, Jensen RG, Parry RM Jr, Zittle CA (1973). Enzymes in bovine milk: a review. *Journal of Dairy Science* 56:531-543.
- Sharma SA, Olchoway TW, Yang Z, Breider MA (1992). Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 alpha enhance lipopolysaccharide-mediated bovine endothelial cell injury.

Journal of Leukocyte Biology 51:579-85.

- Shewen PE, Conlon JAR (1993). *Pasteurella*. In: CL Gyles, CO Thoen (eds) *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*, 2nd edn. Iowa State University Press, Ames, USA, pp. 216-225.
- Shoop DS, Myers LL (1984). Serological analysis of isolates of *Pasteurella haemolytica* and *Staphylococcus aureus* from mastitic ewes. *American Journal of veterinary Research* 45:1944-1946.
- Shuster DE, Bosworth BT, Kehrli ME Jr (1992). Sequence of the bovine CD18-encoding cDNA: comparison with the human and murine glycoproteins. *Gene* 114:267-271.
- Shuster DE, Kehrli ME Jr, Ackermann MR, Gilbert RO (1992). Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. *Proceedings of the national Academy of Sciences of the United States of America* 89:9225-9229.
- Sieber RL, Farnsworth RJ (1984). Differential diagnosis of bovine teat lesions. *Veterinary Clinics of north America - Large Animal Practice* 6:313-321.
- Simmons GC, Ryley JW (1954). Ovine mastitis with special reference to mastitis caused by *Pasteurella mastitidis*. *Odiham Journal of agricultural Science* 11:29-35.
- Skripkin YK, Fyodorov SM, Selisky GD, Somov BA, Alchanghyan LV, Nemenko AA (1992). External protective agents used to prevent occupational dermatoses. *Vestnik Dermatologii i Venerologii* 6:49-52.
- Sladek Z, Rysanek D (2001). Neutrophil apoptosis during the resolution of bovine mammary gland injury. *Research in veterinary Science* 70:41-46.
- Slee J, Springbett A (1986). Early post-natal behaviour in lambs of ten breeds. *Applied animal Behaviour Science* 15:229-240.
- Smith GR (1964). Production of pneumonia in adult sheep with cultures of *Pasteurella haemolytica* Type-A. *Journal of comparative Pathology* 74:242-249.
- Smith KL, Oliver SP (1981). Lactoferrin: a component of nonspecific defense of the involuting bovine mammary gland. *Advances in experimental Medicine and Biology* 137:535-554.
- Sneath PHA, Stevens M (1990). *Actinobacillus rossii* sp. nov., *Actinobacillus seminis* sp. nov. rev., *Pasteurella bettii* sp. nov., *Pasteurella lymphangitidis* sp. nov. *International Journal of systematic Bacteriology* 40:48-153.
- Sordillo LM, Babiuk LA (1991). Controlling acute *Escherichia coli* mastitis during the periparturient period with recombinant bovine interferon-gamma. *Veterinary Microbiology* 28:189-198.
- Sordillo LM, Nickerson SC, Akers RM, Oliver SP (1987). Secretions composition during bovine

- mammary involution and the relationship with mastitis. *International Journal of Biochemistry* 19:1165-1172.
- Sordillo LM, Redmond MJ, Campos M, Warren L, Babiuk LA (1991). Cytokine activity in bovine mammary gland secretions during the periparturient period. *Canadian Journal of Veterinary Research* 55:298-301.
- Sordillo LM, Streicher KL (2002). Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Journal of Mammary Gland Biology* 7:135-146.
- Sordillo LM, Weaver KS, DeRosa D (1997). Immunobiology of the mammary gland. *Journal of Dairy Science* 80:1851-1865.
- Soto P, Natzke RP, Hansen PJ (2003). Identification of possible mediators of embryonic mortality caused by mastitis: actions of lipopolysaccharide prostaglandin F-2 alpha and the nitric oxide generator, sodium nitroprusside dehydrate, on oocyte maturation and embryonic development in cattle. *American Journal of Reproduction and Immunology* 50:263-272.
- Squire PG, Smiley DW, Croskell RB (1984). Identification and extraction of *Pasteurella haemolytica* membrane proteins. *Infection and Immunity* 45:667-673.
- Steenhaut M, Vlamincck L (1995). Treatment of teat and udder lesions in cattle. 1. Supernumerary and accessory teats, teat fistula, teat wounds. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 64:78-79.
- Stefanakis A, Boscoc C, Alexopoulos C, Samartzi F (1995). Frequency of subclinical mastitis and observations on somatic cell counts in ewes milk in Northern Greece. *Animal Science* 61:69-76.
- Stevens PK, Czuprynski CJ (1996). *Pasteurella haemolytica* leukotoxin induces bovine leukocytes to undergo morphologic changes consistent with apoptosis in vitro. *Infection and Immunity* 64:2687-2694.
- Straus DC, Purdy CW, Loan RW, Briggs RF, Frank GH (1998). In vivo production of neuraminidase by *Pasteurella haemolytica* in market stressed cattle after natural infection. *Current Microbiology* 37:240-4.
- Suarez VH, Buseti MR, Miranda AO, Calvino LF, Bedotti DO, Canavesio VR (2002). Effect of infection status and parity on somatic cell count and California mastitis test in Pampinta dairy ewes. *Journal of Veterinary Medicine B* 49:230-234.
- Tagand R (1932). Anatomy of the mammary vessels. *Lait* XII:881-893.

- Tay SK, Jenkins D, Maddox P, Campion M, Singer A (1987). Subpopulations of Langerhans cells in cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus infection. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 94:16-21.
- Thumbikat P, Briggs RE, Kannan MS, Maheswaran SK (2003). Biological effects of two genetically defined leukotoxin mutants of *Mannheimia haemolytica*. *Microbial Pathogenesis* 34:217-226.
- Tontis D, Doukas D, Likotraftis F, Kritsepi-Konstantinou M, Fthenakis GC, Damani E (2005). Dermatopathology and clinical pathology of experimental sarcoptic mange in sheep and the recovery phase after doramectin treatment. *Proceedings of the 6th International Sheep Veterinary Congress*, Hersonissos, Greece, pp. 309-310.
- Torres-Hernandez G, Hohenboken W (1979). Genetic and environmental effects on milk production, milk composition and mastitis incidence in crossbred ewes. *Journal of animal Science* 49:410-417.
- Treece JM, Morese GE, Llevy C (1966). Lipid analyses of bovine teat canal keratin. *Journal of Dairy Science* 49:1240.
- Tunncliff EA (1949). *Pasteurella* mastitis in ewes. *Veterinary Medicine* 49:498-502.
- Turner CN (1952). *The Anatomy of the Udder of Cattle and Domestic Animals*. Lucas Brothers, Columbia, USA.
- Tzora A, Fthenakis GC (1998). Mastitis in dairy ewes associated with *Serratia marcescens*. *Small Ruminant Research* 29:125-126.
- Ubertalle A, Battaglini LM, Fortina R, Bianchi M, Rubino R (1993). Effect of some variation factors on somatic cell count in Delle Langhe sheep milk. *Proceedings of the international Symposium on Somatic Cells and Milk of Small Ruminants*, Bella, Italy, pp. 187-192.
- Uzal FA, Latorraca A, Ghoddusi M, Horn M, Adamson M, Kelly WR, Schenkel R (2000). An apparent outbreak of cutaneous papillomatosis in Merino sheep in Patagonia, Argentina. *Veterinary Research Communications* 24:197-202.
- Vakil JR, Chandan RC, Parry RM, Shahani KM (1969). Susceptibility of several microorganisms to milk lysozymes. *Journal of Dairy Science* 52:1192-1197.
- Van Der Molen EJ, Houwers DJ (1987). Indurative lymphocytic mastitis in sheep after experimental infection with Maedi-Visna virus. *The veterinary Quarterly* 9:193-202.
- Van Der Molen EJ, Vecht U, Houwers DJ (1985). A chronic indurative mastitis in sheep, associated with Maedi-Visna virus infection. *The veterinary Quarterly* 7:112-119.

- Van Kampen C, Mallard BA (1997). Effects of peripartum stress and health on circulating bovine lymphocyte subsets. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 32:13-23.
- Vautor E, Abadie G, Guibert JM, Huard C, Pepin M (2003). Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on farms with dairy sheep using pulsed-field gel electrophoresis. *Veterinary Microbiology* 96:69-79.
- Vaz A (1994). *Some Aspects of the Immunity of Pasteurella Mastitis in Sheep*. Ph.D. thesis, The Royal Veterinary College, University of London.
- 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.
- Vitkov M (1984). Comparative studies of protein A from staphylococci isolated from sheep. *Veterinaro-Meditsinski Nauki* 21:52-56.
- Vlaminck L, Steenhaut M (1995). Treatment of teat and udder lesions in cattle. 2. Stenosis, leaking teat, mastectomy, tumors, hematoma. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 64:90-97.
- Walker FMM (1984). Exocrine and endocrine secretions of the mammary gland: local control in ruminants. *Proceedings of the zoological Society of London* 51:171-191.
- Walker KP (2000). Mammary gland immunology around parturition. Influence of stress, nutrition and genetics. *Advances in experimental Medicine and Biology* 480:231-245.
- Waller KP, Colditz IG, Seow HF (1997). Accumulation of leucocytes and cytokines in the lactating ovine udder during mastitis due to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Research in veterinary Science* 62:63-66.
- Wang Y, Zarlenga DS, Paape MJ, Dahl GE (1997). Recombinant bovine soluble CD14 sensitizes the mammary gland to lipopolysaccharide. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 86:115-124.
- Watkins GH (1990). *Field and Experimental Investigations of Ovine Mastitis caused by Pasteurella haemolytica*. Ph.D. thesis, The Royal Veterinary College, University of London.
- Watkins GH, Burriel AR, Jones JET (1991). A field investigation of subclinical mastitis in sheep in Southern England. *British veterinary Journal* 147:413-420.
- Watkins GH, Jones JET (1992). The effect of intra-mammary inoculation of lactating ewes with *Pasteurella haemolytica* isolates from different sources. *Journal of comparative Pathology* 106:9-14.
- Watson DL, Buswell JF (1984). Modern aspects of sheep mastitis. *British veterinary Journal* 140:529-534.

- Watson DL, Franklin NA, Davies HI, Kettlewell P, Frost AJ (1990). Survey of intramammary infections in ewes on the New England Tableland of New South Wales. *Australian veterinary Journal* 67:6-8.
- Watson PJ, Scholes SFE (2005). Lesions of the oral mucosa in adult sheep in the UK: prevalence and aetiology. *Proceedings of the 6th international Sheep Veterinary Congress, Hersonissos, Greece*, pp. 323-325.
- Watt JAA (1983). Contagious pustular dermatitis. In: WB Martin, ID Aitken (eds) *Diseases of Sheep*. Blackwell, Oxford, UK, pp. 185-188.
- Weaver KAS, Corl CM, Sordillo LM (1999). Shifts in bovine CD+4 subpopulations increase TH-2 compared to TH-1 effector cells during the postpartum period. *Journal of Dairy Science* 82:1696-1706.
- Weaver KAS, Pighetti GM, Sordillo LM (1996). Diminished mammary gland lymphocyte functions parallel shifts in trafficking patterns during the postpartum period. *Proceedings of the Society for experimental Biology and Medicine* 212:271-280.
- Weitz B, Langridge R (1947). Studies on *C. pyogenes* antitoxin in relation to immunity. II. The effect of alum-precipitated toxoid and vaccine on the artificial infection of the udder of the ewe with *C. pyogenes*. *Journal of comparative Pathology and Therapeutics* 57:286-293.
- Welch RA, Forestier C, Lobo A, Pellett S, Thomas W Jr, Rowe G (1992). The synthesis and function of the *Escherichia coli* hemolysin and related RTX exotoxins. *FEMS Microbiology and Immunology* 5:29-36.
- Wellenberg GJ, Van Der Poel WH, Van Oirschot JT (2002). Viral infections and bovine mastitis: a review. *Veterinary Microbiology* 88:27-45.
- William JB, Kirubakaran JJ, Uthuman KM, Kumanan K, Balachandran S (1992). Survey on incidence and complications of bovine cutaneous papillomatosis. *Indian veterinary Journal* 69:843-844.
- Williams DM, Mein GA (1985). The role of machine milking in the invasion of mastitis organisms and implication for maintaining low infection rates. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* 47:415-425.
- Williams DM, Mein GA (1987). Closing forces of the bovine teat canal. *Journal of Dairy Research* 54:321-5.
- Winter P, Rammelmayer A, Baumgartner W (2002). Udder health status of dairy flocks during one lactation period with special regards to infections caused by coagulase-negative staphylococci. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* 89:242-248.
- Wittek T, Elze K, Beck K (1998). Milk composition, somatic cell count, clinical and

bacteriological investigation of udders during lactation in a herd of dairy sheep. *Praktische Tierärztliche* 79:762.

Witzig P, Rusch P, Berchtold M (1984). Characteristics, diagnosis and treatment of ruptured mucous membranes in the teat canal of cows. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 91:219-222.

Yeruham I, Perl S, Abraham A (2000). Orf infection in four sheep flocks. *Veterinary Journal* 160:74-76.

Yirrell DL, Norval M, Reid HW (1994). Local epidermal viral infections: comparative aspects of vaccinia virus, herpes simplex virus and human papillomavirus in man and orf virus in sheep. *FEMS Immunology and medical Microbiology* 8:1-12.

Yount NY, Yuan J, Tarver A, Castro T, Diamond G, Tran PA, Levy JN, McCullough C, Cullor J, Bevins CL, Selsted ME (1999). Cloning and expression of bovine neutrophil beta-defensins. Biosynthetic profile during neutrophilic maturation and localization of mature peptide to novel cytoplasmic dense granules. *Journal of biological Chemistry* 274:26249-26258.

Zecchinon L, Fett T, Desmecht D (2005). How *Mannheimia haemolytica* defeats host defence through a kiss of death mechanism. *Veterinary Research* 36:133-156.

Ziluga I, Romeo M, Marco J (1998). Prevalence, pathogenesis and epidemiology of the microorganisms implicated in the process of mastitis in sheep. *Ovis* 59:27-49.

Ziv G, Shacked A, Risenberg-Tiger R (1968). The effectiveness of the California Mastitis Test as a measure of somatic cell counts of ewe's milk. *Refauh Veterinarith* 25:179-184.

