ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΚΑΙ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΕ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΩΝ ΜΗΡΥΚΑΣΤΙΚΩΝ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ελένη Γ. Κατσόγιαννου DVM, MSc

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια, Λαμπρινή Β. Αθανασίου

Καρδίτσα 2020

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Στη μητέρα μου,

για την αγάπη της

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΚΑΙ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΕ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΩΝ ΜΗΡΥΚΑΣΤΙΚΩΝ

Υποψήφια διδάκτορας:
Ελένη Γ. Κατσόγιαννου, DVM, MSc

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:
Λαμπρινή Β. Αθανασίου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κτηνιατρικής Γενικής Παθολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής Π.Θ., Επιβλέπουσα
Γεώργιος Χριστοδουλόπουλος, Καθηγητής Παθολογίας Παραγωγικών Ζώων, Τμήμα Κτηνιατρικής Π.Θ., Μέλος
Ζωή Πολυζοπούλου, Καθηγήτρια Γενικής Παθολογίας και Προπαιδευτικής, Τμήμα Κτηνιατρικής Α.Π.Θ., Μέλος

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:
Λαμπρινή Β. Αθανασίου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κτηνιατρικής Γενικής Παθολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής Π.Θ.
Γεώργιος Χριστοδουλόπουλος, Καθηγητής Παθολογίας Παραγωγικών Ζώων, Τμήμα Κτηνιατρικής Π.Θ.
Ζωή Πολυζοπούλου, Καθηγήτρια Γενικής Παθολογίας και Προπαιδευτικής, Τμήμα Κτηνιατρικής Α.Π.Θ.
Χαράλαμπος Μπιλλίνης, Καθηγητής Ιολογίας και Ιογενών Νοσημάτων, Τμήμα Κτηνιατρικής Π.Θ.
Βασίλειος Παπατσίρος, Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας Χοίρου, Τμήμα Κτηνιατρικής Π.Θ.
Παναγιώτης Δημήτριος Κατσούλος, Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας Μηρυκαστικών, Τμήμα Κτηνιατρικής Α.Π.Θ.
Δήμητρα Παρδάλη, Επίκουρη Καθηγήτρια Κτηνιατρικής Γενικής Παθολογίας και Προπαιδευτικής, Τμήμα Κτηνιατρικής Α.Π.Θ.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Διαγνωστικό Εργαστήριο της Παθολογικής Κλινικής του Τμήματος Κτηνιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας του Τμήματος Κτηνιατρικής, κ. Λ.Β. Αθανασίου. Θα ήθελα να την ευχαριστήσω θερμά για την ευκαιρία που μου έδωσε να γνωρίσω τον κόσμο της επιστημονικής έρευνας, για την αδιάλειπτη και ακούραστη καθοδήγηση και επίβλεψη από την πρώτη στιγμή που βρέθηκα στην Παθολογική κλινική ως μετεκπαιδευόμενη έως σήμερα. Επιπλέον, θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη, την εμψύχωση και την υπομονή της απέναντί μου, καθώς και για την υποστήριξή της σε διάφορες δύσκολες στιγμές της ζωής μου.

Θα ήθελα να εκφράσω θερμές ευχαριστίες στον κ. Γ. Χριστοδουλόπουλο, Καθηγητή του Τμήματος Κτηνιατρικής του Π.Θ., για τη διάθεση να μοιραστεί μαζί μου την πολύτιμη κλινική του εμπειρία από την αρχή της επαγγελματικής μου σταδιοδρομίας και τις πολύτιμες συμβουλές του, τόσο κατά την διεξαγωγή του ερευνητικού μέρους της διατριβής όσο και κατά τη συγγραφή της.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Ζ. Πολυζοπούλου, Καθηγήτρια του Τμήματος Κτηνιατρικής του Α.Π.Θ., για την πρόσβαση στο διαγνωστικό εργαστήριο του Τμήματος Κτηνιατρικής του Α.Π.Θ. και τη διεξαγωγή μέρους των αναλύσεων αίματος της πρώτης μελέτης της διατριβής μου καθώς και τις συμβουλές και διορθώσεις της στο κείμενο της διατριβής.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Ευχαριστίες, θα ήθελα να απευθύνω και στον κ. Χ. Μπιλλίνη, Καθηγητή του Τμήματος Κτηνιατρικής του Π.Θ, για την εκπαίδευση και την εμβάθυνση κατά τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών στη Μικροβιολογία και τη συμβολή του στη μετέπειτα ερευνητική μου δραστηριότητα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον κ. Β. Παπατσίρο, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Κτηνιατρικής του Π.Θ., για την υποστήριξη κατά τη διάρκεια της διατριβής, μέσα από τις πολύτιμες συζητήσεις μας.

Ευχαριστίες εκφράζω επίσης στον κ. Π.Δ. Κατσούλο, Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Κτηνιατρικής του Α.Π.Θ. για την βοήθεια του, την υποστήριξή του και τις ειδικές συμβουλές του στη διασφάλιση της αξιοπιστίας και την αξιολόγηση των ερευνητικών αποτελεσμάτων.

Ακόμα, θέλω να ευχαριστήσω την κ. Δ. Παρδάλη, Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος Κτηνιατρικής του Α.Π.Θ. για το ενδιαφέρον της για την πορεία της διατριβής μου.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Α. Τζιβάρα, μέλος ΕΔΙΠ του Τμήματος Κτηνιατρικής του Π.Θ., για την υποστήριξή της, το ειλικρινές ενδιαφέρον της , τόσο σε ανθρώπινο όσο και σε επιστημονικό επίπεδο.

Ακόμα, εκφράζω τις ευχαριστίες μου στις κτηνιάτρους της Διεύθυνσης Κτηνιατρικού Κέντρου Αθηνών, του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, κ.κ. Σ. Μπουτσίνη και Δ. Στούγιου για την άψογη συνεργασία τους κατά τη διεξαγωγή των ορολογικών εξετάσεων και τις επιστημονικές συζητήσεις μαζί τους.

Επιπλέον, θα ήταν παράλειψή μου αν δεν ευχαριστούσα τους κτηνιάτρους κ.κ. Χ. Ζιώγα, Κ.Χ. Κοκκινάκη και Σ. Παπαδάκη για την βοήθεια τους στη συλλογή δειγμάτων της διατριβής μου, καθώς και τις συναδέλφους κ.κ. Α.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Κεφαλληνού και Ξ. Ρούσσου για τη βοήθεια που μου προσέφεραν κατά τη διάρκεια της μετεκπαίδευσής τους στην Παθολογική Κλινική του Τμήματος Κτηνιατρικής του Π.Θ.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον προϊστάμενό μου, στο Τμήμα Κτηνιατρικής Λήμνου, κ. Μπουλώτη Δημήτριο καθώς και τον κ. Σουσαλή Κων/νο για το ενδιαφέρον που έδειξαν.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον συνάδελφο κ. Λασκαρίδη Λάσκαρη, που μου επέτρεψε να χρησιμοποιήσω τον εξοπλισμό του κτηνιατρείου του.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου Σοφία, Μαρία, Φάνη και Βαγγέλη που με έχουν στηρίξει και αντέξει όλο αυτό τον καιρό, ώστε να μπορέσω να ολοκληρώσω τη διατριβή.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, κυρίως τη μητέρα μου, Αναστασία, για την υπομονή της απέναντί μου και για τη στήριξή της όλα τα χρόνια της ζωής μου, την αδερφή μου, Ιωάννα, για τις ατέλειωτες ώρες συζητήσεων και υποστήριξης, καθώς και τα αδέρφια μου Ταξιάρχη και Χαρά, που με στήριξαν με τον δικό τους τρόπο.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Συντομογραφίες

EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid/ αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
BASO	Basophil/ Βασίφιλο
BVD	Bovine Virus Diarrhea/ Ιογενής Διάρροια Βοοειδών
EOS	Eosinophil/ Εωσινόφιλο
HCT	Hematocrit/ Αιματοκρίτης
HgB	Hemoglobin/ Αιμοσφαιρίνη
IFAT	Immunofluorescence Antibody Test/ Τεχνική ανοσοφθορισμού του αντισώματος
IMHA	Immune Mediated Hemolytic Anemia/ Ανοσολογικής Αιτιολογίας Αιμολυτική Αναιμία
LYMPH	Lymphocyte/ Λεμφοκύτταρο
MCHC	Mean Cell Hemoglobin Concentration/ Μέση Συγκέντρωση της Αιμοσφαιρίνης ανά Κύτταρο
MCV	Mean Corpuscular Volume/ Μέσος Όγκος Ερυθρών
MONO	Monocyte/ Μονοκύτταρο
NEU	Neutrophil/ Ουδετερόφιλο
PCR	Polymerase Chain Reaction/ Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PCV	Packed Cell Volume/ Αιματοκρίτης
PF	Per Field/ ανά οπτικό πεδίο
RBC	Red Blood Cells/ Ερυθρά αιμοσφαίρια
TBF	Tick Born Fever/ Κροτωνογενής πυρετός
WBC	White Blood Cells/ Λευκά Αιμοσφαίρια
ΣΔΕΠ	Σύνδρομο Διάχυτης Ενδοαγγειακής Πήξης

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ----------4

Συντομογραφίες ----------7

Περιεχόμενα ----------8

Ευρετήριο Πινάκων ---------- 12

Ευρετήριο Γραφημάτων---------- 13

Ευρετήριο Διαγραμμάτων ---------- 15

Ευρετήριο Εικόνων ---------- 15

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι---------- 16

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΗ ΓΕΝΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΑΙΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΜΗΡΥΚΑΣΤΙΚΩΝ---------- 16

1. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ---------- 17

1.1. Πρόλογος ---------- 17

1.1.1. Φυσιολογικοί παράγοντες στο προαναλυτικό στάδιο ---------- 20

1.1.2. Φυσιολογικοί παράγοντες που σχετίζονται με την ανάλυση----- 25

1.1.3. Φυσιολογικοί παράγοντες στο μετα-αναλυτικό στάδιο---------- 28

1.2. Παθολογικοί Παράγοντες---------- 28

1.2.1. Ερυθρά αιμοσφαίρια---------- 29

1.2.1.1. Ερυθροκυττάρωση---------- 29

1.2.1.2. Αναιμία ---------- 31

1.2.2. Λευκά Αιμοσφαίρια---------- 42

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

1.2.2.1. Λευκοκυττάρωση---------- 42

1.2.2.2. Λευκοπενία ---------- 45

1.2.3. Αιμοπετάλια---------- 47

1.2.3.1. Θρομβοκυττάρωση ---------- 48

1.2.3.2. Θρομβοκυτταροπενία ---------- 48

1.2.4. Μορφολογικές ανωμαλίες και Έγκλειστα κυττάρων ---------- 52

1.2.4.1. Ερυθρά αιμοσφαίρια ---------- 52

1.2.4.2. Λευκά αιμοσφαίρια ---------- 54

1.2.4.3. Αιμοπετάλια ---------- 55

2. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ---------- 56

3. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ---------- 79

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ---------- 81

ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΤΗΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ Β12 ΠΡΙΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑ ΤΟΝ ΑΠΟΓΑΛΑΚΤΙΣΜΟ ΚΑΙ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΤΟΥΣ ΜΕ ΤΙΣ ΤΙΜΕΣ ΤΩΝ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΤΩΝ ΜΟΣΧΩΝ---------- 81

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ---------- 82

1.1. Βιταμίνη Β12 ---------- 82

1.1.1. Σύνθεση ---------- 82

1.1.2. Μεταβολισμός---------- 83

1.1.3. Λειτουργίες---------- 85

1.1.4. Ανάγκες---------- 87

1.1.5. Ανεπάρκεια ---------- 88

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

1.1.6. Τοξίκωση ---------- 90

1.2. Ηλικία ---------- 91

2. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ---------- 92

3. ΜΕΘΟΔΟΙ- ΤΕΧΝΙΚΕΣ ---------- 93

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ ---------- 98

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ---------- 104

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ---------- 105

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ ---------- 110

ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΑΡΙΘΜΟΥ ΤΩΝ ΛΕΥΚΩΝ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΕΠΙΧΡΙΣΜΑΤΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΜΕ ΤΟΝ ΑΥΤΟΜΑΤΟ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΑΝΑΛΥΤΗ ADVIA 120 (SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS, DEERFIELD, IL, USA) ---------- 110

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ---------- 111

1.1. Αυτόματοι αιματολογικοί αναλυτές ---------- 111

1.2. Επίχρισμα αίματος ως μέθοδος ανάλυσής του ---------- 114

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ---------- 116

3. ΜΕΘΟΔΟΙ- ΤΕΧΝΙΚΕΣ ---------- 117

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ ---------- 120

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ---------- 127

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ---------- 128

ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV---------- 131

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΣΤΗ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΤΟΝ ΑΡΙΘΜΟ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΒΑΤΩΝ ΥΣΤΕΡΑ ΑΠΟ ΦΥΣΙΚΗ ΜΟΛΥΝΣΗ Η΄/ΚΑΙ ΕΚΘΕΣΗ ΣΤΟ *Anaplasma phagocytophilum* ---------- 131

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ---------- 132

1.1. *Anaplasma phagocytophilum*- Ταξινόμηση- Μετάδοση ---------- 132

1.2. Κλινική εικόνα ---------- 133

1.3. Αιματολογικές διαταραχές ---------- 133

1.4. Διαγνωστικές μέθοδοι ---------- 134

1.4.1. Μέθοδοι με τις οποίες διαπιστώνεται άμεσα το A. phagocytophilum ---------- 134

1.4.2. Μέθοδοι με τις οποίες διαπιστώνεται έμμεσα το A. phagocytophilum ---------- 136

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ---------- 137

3. ΜΕΘΟΔΟΙ – ΤΕΧΝΙΚΕΣ ---------- 138

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ---------- 143

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ---------- 154

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ ---------- 161

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ---------- 163

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ---------- 171

SUMMARY ---------- 177

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας 1. Φυσιολογικοί παράγοντες που επιδρούν στα διάφορα στάδια της ανάλυσης ενός δείγματος.	**19**
Πίνακας 2. Παράγοντες που προκαλούν αναιμία στα μηρυκαστικά	**33**
Πίνακας 3. Ανάλυση της τροφής που χρησιμοποιήθηκε στους μόσχους πριν τον απογαλακτισμό	**94**
Πίνακας 4. Σύνθεση και ανάλυση των θρεπτικών συστατικών της συμπυκνωμένης τροφής που προσφέρεται *ad libitum* στους μόσχους μετά τον απογαλακτισμό	**95**
Πίνακας 5. Μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα του μέσου όρου της βιταμίνης Β12 και των αιματολογικών παραμέτρων στους μη-απογαλακτισμένους και στους απογαλακτισμένους μόσχους	**99**
Πίνακας 6. Συντελεστές συσχέτισης (R) μεταξύ της βιταμίνης Β12 και των αιματολογικών παραγόντων στο σύνολο των μόσχων που ελέγχθηκαν, στους μόσχους μη- απογαλακτισμένους και στους απογαλακτισμένους μόσχους	**103**
Πίνακας 7. Μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα για τον αιματοκρίτη (PCV), τον αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων (WBCs) και τον αριθμό των αιμοπεταλίων (PLTs) στο περιφερικό αίμα προβάτων από διαφορετικές ομάδες και σύγκριση μεταξύ των ομάδων	**143**
Πίνακας 8. Μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα για τα επιμέρους κύτταρα των λευκών αιμοσφαιρίων (WBCs) στο περιφερικό αίμα των προβάτων από διαφορετικές ομάδες και σύγκριση μεταξύ των ομάδων	**145**

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Ευρετήριο Γραφημάτων

Γράφημα 1. *Γραφική παράσταση γραμμικής παλινδρόμησης μεταξύ του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων που υπολογίστηκαν από τον αναλυτή ADVIA (WBC1_ADVIA) και του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων ανά οπτικό πεδίο που υπολογίστηκαν με τον αντικειμενικό φακό 40Χ στο επίχρισμα του αίματος*	**114**
Γράφημα 2. *Γραφική παράσταση παλινδρόμησης κατά την ανάλυση Passing and Bablok μεταξύ του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων που υπολογίστηκαν από τον αναλυτή ADVIA (WBC1_ADVIA) και τον υπολογισμένο αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων (WBC1_Calc) βάσει της εξίσωσης της γραμμικής παλινδρόμησης*	**121**
Γράφημα 3. *Γραφική παράσταση με τη μέθοδο Bland–Altman όπου παρουσιάζεται η διαφορά μεταξύ του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων που υπολογίστηκαν από τον αναλυτή ADVIA (WBC1_ADVIA) σε σχέση με τον υπολογισμένο αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων (WBC1_Calc) βάσει της εξίσωσης γραμμικής παλινδρόμησης*	**122**
Γράφημα 4. *Γραφική παράσταση κατά τη μέθοδο Bland-Altman όπου παρουσιάζεται η διαφορά μεταξύ του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων που υπολογίστηκε από τον αναλυτή ADVIA (WBC2_ADVIA) σε 31 νέα δείγματα σε σχέση με τον υπολογισμένο αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων (WBC2_Calc) με βάση την γραμμικής εξίσωση παλινδρόμησης στα ίδια 31 δείγματα*	**123**
Γράφημα 5. *Γραφική παράσταση κατά τη μέθοδο Bland-Altman που δείχνει τη διαφορά μεταξύ του αριθμού των αιμοπεταλίων που υπολογίστηκε από τον αναλυτή ADVIA (PLT_ADVIA) και του αριθμού των αιμοπεταλίων που υπολογίστηκε με μέτρηση των αιμοπεταλίων στο επίχρισμα του αίματος πολλαπλασιασμένη με τον παράγοντα 1 (PLT_15)*	**124**
Γράφημα 6. *Γραφική παράσταση κατά τη μέθοδο Bland-Altman που δείχνει τη διαφορά μεταξύ του αριθμού των αιμοπεταλίων που υπολογίστηκε από τον αναλυτή ADVIA (PLT_ADVIA) και του αριθμού των αιμοπεταλίων που υπολογίστηκε με μέτρηση των αιμοπεταλίων στο επίχρισμα του αίματος πολλαπλασιασμένη με τον παράγοντα 2 (PLT_20)*	**125**
Γράφημα 7. *Γραφική παράσταση στην οποία αποτυπώνεται το ποσοστό των προβάτων ανά ομάδα, στα οποία ο αιματοκρίτης ήταν εντός (PCV ΚΦ) και εκτός (PCV ↓) των ορίων αναφοράς, αντίστοιχα*	**145**
Γράφημα 8. *Γραφική παράσταση στην οποία αποτυπώνεται το ποσοστό των προβάτων ανά ομάδα, στα οποία ο συνολικός αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων ήταν εντός (WBC ΚΦ) και εκτός (WBC ↓) ορίων αναφοράς, αντίστοιχα*	**147**

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Ευρετήριο Γραφημάτων (συνέχεια)

Γράφημα 9. *Γραφική παράσταση στην οποία αποτυπώνεται το ποσοστό των προβάτων ανά ομάδα, στα οποία ο αριθμός των αιμοπεταλίων ήταν εντός (PLT ΚΦ) και εκτός (PLT ↓) ορίων αναφοράς, αντίστοιχα*	**148**
Γράφημα 10. *Γραφική παράσταση στην οποία αποτυπώνεται το ποσοστό των προβάτων ανά ομάδα, στα οποία ο αριθμός των ουδετεροφίλων ήταν εντός (NEU ΚΦ) και εκτός (NEU ↓) ορίων αναφοράς, αντίστοιχα*	**149**
Γράφημα 11. *Γραφική παράσταση στην οποία αποτυπώνεται το ποσοστό των προβάτων ανά ομάδα, στα οποία ο αριθμός των λεμφοκυττάρων ήταν εντός (LYMPH ΚΦ) και εκτός (LYMPH ↓) ορίων αναφοράς, αντίστοιχα*	**150**
Γράφημα 12. *Γραφική παράσταση στην οποία αποτυπώνεται το ποσοστό των προβάτων ανά ομάδα, στα οποία παρατηρήθηκαν ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα ή μονοκύτταρα στο επίχρισμα του αίματος*	**152**
Γράφημα 13. *Χρονική διάρκεια α) παρουσίας αντισωμάτων κατά του A. phagocytophilum (Paxton and Scott, 1989; Stuen and Artursson, 2000; Stuen et al., 2009) και β) ανίχνευσης εγκλείστων του βακτηρίου στα κύτταρα του αίματος κατά τη μικροσκοπική εξέταση του επιχρίσματος του αίματος (Gokce and Woldehiwet, 1999a; Stuen et al., 1998; Whist et al., 2002). Επιπλέον παρουσιάζεται η πιο πιθανή αντίστοιχη θέση της μόλυνσης ή/και της έκθεσης των προβάτων κάθε ομάδας*	**155**

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Ευρετήριο Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1. *Σχηματική παρουσίαση των μηχανισμών της ερυθροκυττάρωσης*	**29**
Διάγραμμα 2. *Ταξινόμηση της αναιμίας*	**32**
Διάγραμμα 3. *Παράγοντες που προκαλούν μεταβολές στον αριθμό των WBCs και των επιμέρους ειδών κυττάρων.*	**47**
Διάγραμμα 4. *Παράγοντες που προκαλούν μεταβολές στον αριθμό των PLTs.*	**51**

Ευρετήριο Εικόνων

Εικόνα 1. Κυτταρολογική εξέταση επιχρίσματος αίματος προβάτου, όπου διαπιστώθηκε η παρουσία *Anaplasma phagocytophilum* σε ουδετερόφιλο, χρώση Giemsa, 1000X	**139**
Εικόνα 2. Έμμεσος ανοσοφθορισμός παρουσία φθοριζόντων *Anaplasma phagocytophilum,* 1000X	**141**

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΗ ΓΕΝΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΑΙΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΜΗΡΥΚΑΣΤΙΚΩΝ

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

1. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

1.1. Πρόλογος

Το αίμα, αναφέρεται ως ένας από τους τέσσερις χυμούς (αίμα, φλέγμα, ξανθή χολή, μαύρη χολή) του Ιπποκράτη. Η ανάμειξη μάλιστα των χυμών αυτών σε ορθή αναλογία («ευκρασία») αποτελεί προϋπόθεση υγείας, καθώς στην περίπτωση που υπάρξει πλεόνασμα ή έλλειψη τους («δυσκρασία»), η κατάσταση του σώματος εκτρέπεται προς το παθολογικό (Ιπποκράτης, 460-377 π.Χ).

Στην σύγχρονη ιατρική του ανθρώπου και των ζώων, οι εξετάσεις που γίνονται στο αίμα μπορεί να παρέχουν πλειάδα διαγνωστικών πληροφοριών. Από αυτές, η γενική εξέταση του αίματος είναι από τις σημαντικότερες και τις συχνότερα διενεργούμενες εργαστηριακές εξετάσεις, καθώς τα ευρήματά της συμβάλλουν στη διάγνωση και την παρακολούθηση των νοσημάτων και την αξιολόγηση της εφαρμοζόμενης θεραπείας.

Οι κτηνιατρικοί αιματολογικοί αναλυτές συνέβαλαν σημαντικά στην ευρύτερη πραγματοποίηση της γενικής εξέτασης του αίματος, αρχικά στα ζώα συντροφιάς και αργότερα και στα παραγωγικά ζώα. Ωστόσο, όσον αφορά στα μηρυκαστικά, ειδικές ρυθμίσεις είναι διαθέσιμες για τα περισσότερα είδη μηρυκαστικών στους υψηλού κόστους αναλυτές εξειδικευμένων εργαστηρίων, ενώ στους συνήθεις αιματολογικούς αναλυτές κτηνιατρείων περιορίζονται στα βοοειδή.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Η γενική εξέταση του αίματος περιλαμβάνει τον ποσοτικό προσδιορισμό και την εκτίμηση της μορφολογίας των έμμορφων συστατικών του αίματος. Η ποσοτική μελέτη αφορά στον ολικό αριθμό των κυττάρων του αίματος (ερυθρών, λευκών συμπεριλαμβανομένων και των επιμέρους ειδών τους, αιμοπεταλίων). Η μορφολογική διερεύνηση των αιμοσφαιρίων αφορά σε αλλαγές στο μέγεθος, το σχήμα, τη χροιά καθώς και στην παρουσία εγκλείστων και κενοτοπίων.

Η μεταβολή των τιμών των παραμέτρων της γενικής εξέτασης του αίματος είναι αποτέλεσμα της επίδρασης φυσιολογικών και παθολογικών καταστάσεων.

Οι φυσιολογικοί παράγοντες διακρίνονται σχηματικά σε αυτούς που επιδρούν στο προαναλυτικό στάδιο, σε αυτούς που σχετίζονται με τη μέθοδο ανάλυσης και αυτούς που επιδρούν μετά τη ανάλυση του δείγματος (Camus, 2016; Stockham and Scott, 2008).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Πίνακας 1*: Φυσιολογικοί παράγοντες που επιδρούν στα διάφορα στάδια της ανάλυσης ενός δείγματος*.

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ		
ΠΡΟΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΤΑΔΙΟ	**ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΤΑΔΙΟ**	**ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΤΑΔΙΟ**
ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ	Αναλυτής • Χειρισμός • Βλάβη	Διαχείριση δεδομένων (αποθήκευση, αποστολή)
Ενδογενείς • Είδος ζώου • Φυλή ζώου • Φύλο • Ηλικία • Στάδιο αναπαραγωγής	Εμπειρία προσωπικού	
Ελεγχόμενοι • Διατροφή • Συνθήκες διαβίωσης • Προληπτική λήψη φαρμάκων • Άσκηση • Καταστάσεις καταπόνησης	Μέθοδος ανάλυσης	
ΜΗ- ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ		

• Παραπεμπτικό
• Συλλογή
  ○ αιμοληψία (τεχνική, σημείο αιμοληψίας, βελόνα)
  ○ φιαλίδια συλλογής αίματος, είδος αντιπηκτικού
• Σήμανση
• Χειρισμός δείγματος από τη λήψη έως την ανάλυσή του
• Συνθήκες συντήρησης δείγματος έως την ανάλυσή του		

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

1.1.1. Φυσιολογικοί παράγοντες στο προαναλυτικό στάδιο

Οι προαναλυτικοί παράγοντες είναι ειδικοί του ατόμου, δηλαδή σχετίζονται με το ίδιο το ζώο (βιολογικοί παράγοντες), αλλά και με τη συλλογή του δείγματος καθώς και με το χειρισμό του (μη-βιολογικοί παράγοντες) (Braun et al., 2015). Από τους παράγοντες αυτούς μπορεί να ελεγχθούν κατά κανόνα οι μη βιολογικοί καθώς και ορισμένοι από τους βιολογικούς.

Ωστόσο, είναι σημαντικός ο καθορισμός της επίδρασης βιολογικών παραγόντων στις τιμές των εργαστηριακών εξετάσεων για την ορθότερη ερμηνεία των αποτελεσμάτων τους.

Οι βιολογικοί προαναλυτικοί παράγοντες που επηρεάζουν τα αποτελέσματα των αιματολογικών παραμέτρων αφορούν στο είδος του ζώου, καθώς για κάθε είδος ζώου διαμορφώνονται διαφορετικά όρια αναφοράς για την κάθε παράμετρο (Byers and Kramer, 2010). Επιπλέον, σημαντικό ρόλο παίζει και η φυλή του ζώου. Ειδικότερα για τα μηρυκαστικά διαπιστώθηκαν διαφορές στα όρια αναφοράς των τιμών των αιματολογικών παραμέτρων κριών της φυλής Χίου και κριών της φυλής Φλώρινας, που προσδιορίστηκαν στον ίδιο αιματολογικό αναλυτή και κάτω από τις ίδιες συνθήκες (Oikonomidis et al., 2018). Σε μια μελέτη σε βοοειδή (Mirzadeh et al., 2010) διαπιστώθηκε ότι υπάρχουν διαφορές όχι μόνο ανάμεσα στις φυλές των βοοειδών, αλλά ανάμεσα και στο φύλο και την ηλικία τους. Στην ίδια μελέτη διαπιστώθηκε ότι διαφορετικές τιμές στις αιματολογικές παραμέτρους έχουν και οι αγελάδες, που βρίσκονται σε διαφορετικά στάδια αναπαραγωγής, όπως στην

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

εγκυμοσύνη, τη ξηρά περίοδο ή τη γαλακτοπαραγωγική περίοδο (Bezerra et al., 2017).

Επιπλέον στα μηρυκαστικά περιγράφονται μεταβολές του αριθμού των επιμέρους ειδών των λευκών αιμοσφαιρίων ανάλογα με την ηλικία. Στην ηλικία των 2 εβδομάδων περίπου κυριαρχούν τα ουδετερόφιλα, ενώ λίγο αργότερα οι αναλογίες αλλάζουν υπέρ των λεμφοκυττάρων με αποτέλεσμα ο λόγος ουδετεροφίλων/ λεμφοκυττάρων να είναι περίπου 0,5- 0,6 μέχρι και την ενήλικη ζωή των αιγών και των προβάτων (Byers and Kramer, 2010). Στις ενήλικες αίγες ο λόγος αυτός είναι περίπου 1.0, ενώ στις νεαρές αίγες ισχύει ότι ισχύει και για τους μόσχους και τους αμνούς. Στους μόσχους αυτή η αναλογία αρχίζει να αλλάζει από την 7^{η} ημέρα της ζωής τους (Egli and Blum, 1998). Μεταβολές έχουν διαπιστωθεί και σε άλλες αιματολογικές παραμέτρους, όπως RBCs, HgB και PCV σε μόσχους, οι οποίες αρχικά αυξάνονται από την πρώτη έως τη δεύτερη εβδομάδα της ζωής τους και στη συνέχεια μειώνονται (Jezek et al., 2011).

Επιπλέον, άλλοι παράγοντες που αφορούν στο ίδιο το ζώο είναι οι συνθήκες διατροφής και διαβίωσης. Σε μελέτη που έγινε σε μόσχους διαπιστώθηκαν διαφορές στις τιμές των αιματολογικών παραμέτρων ανάμεσα σε αυτούς που διατρέφονταν με υποκατάστατο γάλακτος και αυτούς που διατρέφονταν με μητρικό γάλα (Klinkon and Ježek, 2012). Αναφέρεται επίσης ότι και η εποχή του έτους επηρεάζει τις αιματολογικές παραμέτρους (Mirzadeh et al., 2010). Η γεωγραφική θέση και ειδικότερα το υψόμετρο φαίνεται ότι επιδρά στη μορφολογία και το μέγεθος των ερυθρών αιμοσφαιρίων (Adili and Melizi, 2013; Adili et al., 2013). Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τα αποτελέσματα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

των αιματολογικών εξετάσεων είναι η έντονη άσκηση και οι καταστάσεις έντονης καταπόνησης όπως η μεταφορά σε μεγάλη απόσταση (Alam et al., 2018) πριν την αιμοληψία καθώς και η προληπτική λήψη φαρμάκων (Canning et al., 2017).

Γενικότερα, αλλαγές που αφορούν στη διαχείριση των ζώων επιδρούν στις αιματολογικές εξετάσεις. Σε συγκριτική μελέτη (George et al., 2010) των τιμών αναφοράς (φυσιολογικά όρια) που είχαν ορισθεί από το 1957 έως το 2006 για διάφορες αιματολογικές παραμέτρους στα βοοειδή διαπιστώθηκαν σημαντικές αποκλίσεις στις τιμές αναφοράς των ουδετεροφίλων, οι οποίες αυξήθηκαν στο πέρασμα του χρόνου, αλλά μειώθηκαν αυτές των λεμφοκυττάρων, μονοπύρηνων και εωσινόφιλων καθώς και της συγκέντρωσης της αιμοσφαιρίνης. Οι αλλαγές αυτές, αποδόθηκαν στην αλλαγή της διαχείρισης των ζώων, όπως για παράδειγμα, η μείωση των εωσινοφίλων η οποία ενδεχομένως σχετίζεται με την αύξηση της εφαρμογής προληπτικών αποπαρασιτισμών.

Εκτός από ότι αφορά στο ίδιο το ζώο, όπως προαναφέρθηκε, υπάρχουν και οι μη-βιολογικοί παράγοντες που επηρεάζουν τα αποτελέσματα και επιδρούν στο δείγμα πριν την ανάλυσή του. Στο στάδιο αυτό, το ποσοστό των σφαλμάτων κυμαίνεται από 40 έως 75% των συνολικών σφαλμάτων που συμβαίνουν σε ένα εργαστήριο. Το ποσοστό αυτό μειώνεται όταν γίνει έγκαιρος εντοπισμός τους και διόρθωσή τους (Braun et al., 2015; Camus, 2016).Οι μη –βιολογικοί παράγοντες αφορούν στη διαδικασία λήψης του αίματος και το χειρισμό του μέχρι τη μεταφορά του στο εργαστήριο και την αποθήκευσή του έως την ανάλυσή του (Braun et al., 2015).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Η αιμοληψία στα μικρά μηρυκαστικά και τους μόσχους με σωματικό βάρος μικρότερο ή ίσο των 300kg γίνεται από τη σφαγίτιδα φλέβα, ενώ για τα μεγαλύτερου βάρους συστήνεται η κοκκυγική (Divers and Peek, 2018). Οι βελόνες που χρησιμοποιούνται έχουν διάμετρο 18 ή 20G για τα βοοειδή και τα ενήλικα μικρά μηρυκαστικά, ενώ για τους αμνούς και τα ερίφια χρησιμοποιούνται συνήθως βελόνες 22G. Το μήκος τους κυμαίνεται από 1-1,5 ίντσα (Cebra and Cebra, 2002; Divers and Peek, 2018). Ωστόσο, στα μηρυκαστικά δεν αναφέρονται πιθανές μεταβολές στις τιμές των αιματολογικών παραμέτρων που σχετίζονται με το αγγείο από το οποίο γίνεται η αιμοληψία, όπως αυτές που περιγράφονται για τα ζώα συντροφιάς και εργαστηρίου (Braun et al., 2015).

Οι χειρισμοί κατά την αιμοληψία φαίνεται ότι επηρεάζουν την ποιότητα του δείγματος προκαλώντας «παρεμβολές» (interferences), όπως η αιμόλυση ή η δημιουργία μικρών συσσωματωμάτων λόγω της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, δίνοντας λανθασμένη εντύπωση αιμοσυγκόλλησης (Stockham and Scott, 2008).

Η συνήθης πρακτική αιμοληψίας στα μηρυκαστικά με τη χρήση συστημάτων βελόνας-φιαλιδίων κενού αέρος μειώνει τις πιθανότητες σχηματισμού συσσωματωμάτων λόγω καθυστερημένης μετάγγισης του αίματος από τη σύριγγα σε φιαλίδιο, όπως και ιατρογενούς αιμόλυσης λόγω βίαιης εξώθησης του αίματος από τη σύριγγα στο κατάλληλο φιαλίδιο (Harvey, 2001).

Το είδος του αντιπηκτικού που χρησιμοποιείται αποτελεί ένα ακόμη μη-βιολογικό παράγοντα που επιδρά σε αιματολογικές παραμέτρους καθώς η

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

χρήση του κιτρικού αντί του γενικώς συνιστώμενου EDTA, έχει σαν αποτέλεσμα 10% απόκλιση από τον πραγματικό αριθμό (Zmigrodzka et al., 2012), ενώ τα αιμοπετάλια μπορεί να έχουν και μεγαλύτερη λόγω των μικρών συσσωματωμάτων που σχηματίζονται κατά την παραμονή τους μέσα στο φιαλίδιο με το κιτρικό (Stokol and Erb, 2007). Χρησιμοποιώντας ηπαρίνη ως αντιπηκτικό είναι επίσης πιθανό να δημιουργηθούν συσσωματώματα αιμοπεταλίων και λευκών αιμοσφαιρίων που θα οδηγήσουν σε εσφαλμένο προσδιορισμό του απόλυτου αριθμού τους (Harvey, 2001; Stockham and Scott, 2008).

Η ανεπαρκής πλήρωση του φιαλιδίου με αίμα συνδέεται με μορφολογικές μεταβολές και συγκεκριμένα συρρίκνωση των ερυθρών αιμοσφαιρίων λόγω της επαφής με το υπέρτονο EDTA και συνεπακόλουθα με ψευδή μείωση του MCV και ψευδή αύξηση του MCHC (Weiser, 2005). Επίσης η υπερπλήρωση οδηγεί σε πήξη του αίματος και καθιστά το δείγμα ακατάλληλο για ανάλυση.

Ο χρόνος καθώς και οι συνθήκες συντήρησης του δείγματος μεταξύ της αιμοληψίας και της ανάλυσής του αποτελούν δύο ακόμα παράγοντες που επιδρούν στις τιμές των αιματολογικών παραμέτρων και πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Ειδικότερα, στα βοοειδή διαπιστώθηκε μακροκυττάρωση, υποχρωμία και μακροθρομβοκυττάρωση ύστερα από καθυστερημένη ανάλυση σε χρόνο μεγαλύτερο από 24 ώρες μετά τη λήψη του δείγματος. Αντίθετα, η συντήρηση του δείγματος στους 4°C για 24 ώρες δεν φαίνεται να προκαλεί κλινικά σημαντικές μεταβολές στις τιμές των αιματολογικών παραμέτρων (Warren et al., 2012). Για την επίτευξη των παραπάνω συνθηκών συντήρησης

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

συνιστάται η μεταφορά τους σε ισοθερμικό κουτί με παγοκύστεις. Θα πρέπει όμως να αποφεύγεται η άμεση επαφή των παγοκύστεων με τα δείγματα, η οποία θα μπορούσε να τα καταστήσει ακατάλληλα για ανάλυση (Camus, 2016).

1.1.2. Φυσιολογικοί παράγοντες που σχετίζονται με την ανάλυση

Οι μέθοδοι προσδιορισμού των κυττάρων του αίματος επιδρούν στις τιμές των αιματολογικών παραμέτρων είτε πρόκειται για τις παλαιότερες μεθόδους (κυτταρολογική εξέταση επιχρίσματος αίματος, προσδιορισμός των κυττάρων σε αιματοκυτταρόμετρο Neubauer) είτε σε τεχνολογικά προηγμένους αιματολογικούς αναλυτές (Athanasiou et al., 2013). Η επίδραση της μεθόδου στις τιμές των αιματολογικών παραμέτρων έχει ως αποτέλεσμα την ανάγκη προσδιορισμού διαφορετικών τιμών αναφοράς για κάθε χρησιμοποιούμενη μέθοδο. Επίσης, έχει διαπιστωθεί ότι η ποιότητα του επιχρίσματος αίματος μπορεί να επηρεάσει τον προσδιορισμό του αριθμού των κυττάρων του αίματος. Η ανισοκατανομή των κυττάρων είναι συνήθης ύστερα από την άσκηση υπερβολικής πίεσης κατά την επίστρωση με αποτέλεσμα τη συγκέντρωση των λευκών στην περιοχή του άκρου («φτερό») (Stiene-Martin, 1980). Επιπλέον, ο αριθμός των πεδίων στο προσοφθάλμιο έχει διαπιστωθεί ότι επηρεάζει τον προσδιορισμό του αριθμού των αιμοπεταλίων (George, 1999).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Ο περιορισμός της μεγάλης διακύμανσης των αποτελεσμάτων στο αναλυτικό στάδιο και η αποφυγή σφαλμάτων επιτυγχάνεται με την εφαρμογή συστημάτων ποιότητας (Athanasiou, 2014). Σημειώνεται ότι στο αναλυτικό στάδιο, τα σφάλματα αφορούν αποκλειστικά το προσωπικό και τον εξοπλισμό του εργαστηρίου και φτάνουν το 20% των σφαλμάτων (Westgard QC).

Διάφορες ουσίες όπως τα λιπίδια, η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη και η χολερυθρίνη μπορούν να προκαλέσουν παρεμβολές, που επηρεάζουν τα αποτελέσματα των αιματολογικών αναλύσεων. Βέβαια, είναι μεν παράγοντες που σχετίζονται με την ανάλυση των δειγμάτων, αλλά μπορεί να θεωρηθούν και προαναλυτικοί παράγοντες (λιπίδια, ελεύθερη αιμοσφαιρίνη, φάρμακα) καθώς μπορεί να περιοριστούν κατά τη διαδικασία συλλογής (πχ. αιμόλυση λόγω κακής τεχνικής αιμοληψίας) και διαχείρισης του δείγματος (Medaille and Briend-Marchal, 2008).

Η λιπαιμία επηρεάζει τις αιματολογικές παραμέτρους όταν η ανάλυση γίνεται σε αιματολογικό αναλυτή που προσδιορίζει τη συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων, μέσω της σκέδασης του φωτός. Στην περίπτωση αυτή επηρεάζονται και οι δείκτες που σχετίζονται με την αιμοσφαιρίνη, όπως η MCH και η MCHC. Επιπλέον η έντονη λιπαιμία ενδέχεται να προκαλέσει αύξηση του αριθμού των αιμοπεταλίων καθώς τα μεγάλα μόρια λίπους προσμετρούνται λανθασμένα ως αιμοπετάλια (Medaille and Briend-Marchal, 2008). Ωστόσο, ενώ στα άλλα είδη ζώων απαιτείται νηστεία 12 ωρών πριν την αιμοληψία για την αποφυγή λιπαιμίας, στα μηρυκαστικά λόγω της συνεχούς δραστηριότητας της μεγάλης κοιλίας και της πέψης καθώς και της σύστασης της τροφής, το πρόσφατο γεύμα δεν

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

επηρεάζει σημαντικά τις τιμές των αιματολογικών παραμέτρων. Γι' αυτό άλλωστε δεν απαιτείται νηστεία πριν την αιμοληψία. Επιπλέον, σε ότι αφορά στη συγκέντρωση των τριγλυκεριδίων και της χολοστερόλης, είναι σπάνιες οι μεταβολές τους σε μηρυκαστικά με υπερβολικό αρνητικό ενεργειακό ισοζύγιο (Radin, 2012).

Η αιμόλυση μπορεί να συμβεί *in-vitro* είτε λόγω σφάλματος στην αιμοληψία και εσφαλμένης επιλογής αντιπηκτικού, είτε ως αποτέλεσμα λιπαιμίας και παρατεταμένης ή κακής συντήρησης του δείγματος. *In-vivo* μπορεί να συμβεί λόγω αιμοπαρασίτωσης, τοξινώσεων και ανοσολογικών αντιδράσεων (Medaille and Briend-Marchal, 2008).

Η αιμόλυση επηρεάζει τον αριθμό των ερυθρών αιμοσφαιριών και τον αιματοκρίτη. Η συγκέντρωση, όμως, της αιμοσφαιρίνης επηρεάζεται μόνο όταν ο προσδιορισμός της γίνεται υπολογιστικά με βάση τον αιματοκρίτη, ενώ όταν γίνεται από αιματολογικό αναλυτή με μέθοδο που περιλαμβάνει τη λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων, η ολική συγκέντρωσή της δεν μεταβάλλεται. Ωστόσο, η αιμοσφαιρίνη που βρίσκεται στα ερυθρά αντικατοπτρίζει καλύτερα τη δυνατότητα μεταφοράς οξυγόνου και γι' αυτό έχει μεγαλύτερη διαγνωστική αξία. Σε ότι αφορά τα αιμοπετάλια, η παρουσία θραυσμάτων ερυθρών με μέγεθος που πλησιάζει αυτό των αιμοπεταλίων, συχνά προκαλεί εσφαλμένη καταμέτρησή τους ως αιμοπετάλια και συνεπώς αύξηση του αριθμού των αιμοπεταλίων (Athanasiou et al., 2018).

Τέλος, η παρουσία χολερυθρίνης (ίκτερος), ως αποτέλεσμα χολόστασης ή χολολιθίασης [παρασίτωση από δίστομα (Katsoulos et al., 2011)], χάλκωσης

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

(Christodoulopoulos and Roubies, 2007) ή αιμόλυσης (αιμοπαρασίτωση) (Bal et al., 2016) στα μηρυκαστικά φαίνεται ότι έχει περιορισμένη επίδραση στις αιματολογικές παραμέτρους αν και οι σχετικές πειραματικές μελέτες περιορίζονται έως τώρα μόνο στα ζώα συντροφιάς (Gupta and Stockham, 2014). Ενδεχόμενες μεταβολές των αιματολογικών παραμέτρων σε αιμολυτικό ίκτερο φαίνεται ότι είναι αποτέλεσμα της ίδιας της αιμόλυσης και όχι του ίκτερου.

1.1.3. Φυσιολογικοί παράγοντες στο μετα-αναλυτικό στάδιο

Στο στάδιο αυτό, ουσιαστικά δεν υπάρχει φυσιολογική μεταβλητότητα παρά μόνο λάθη που αφορούν στη διαχείριση, αρχειοθέτηση και αποστολή των αποτελεσμάτων (Camus, 2016).

1.2. Παθολογικοί Παράγοντες

Οι παθολογικοί παράγοντες και οι νοσολογικές καταστάσεις προκαλούν αύξηση ή μείωση του αριθμού των κυττάρων του αίματος ή ανωμαλίες στη μορφολογία τους παρουσιάζονται ταξινομημένοι ανάλογα με τη μεταβολή που προκαλούν και ανά είδος κυττάρων (ερυθρά αιμοσφαίρια, λευκά αιμοσφαίρια, αιμοπετάλια).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

1.2.1. Ερυθρά αιμοσφαίρια

1.2.1.1. Ερυθροκυττάρωση

Η ερυθροκυττάρωση, ορίζεται ως η αύξηση του αριθμού των ερυθρών αιμοσφαιρίων στο περιφερικό αίμα, της συγκέντρωσης της αιμοσφαιρίνης και του αιματοκρίτη πάνω από τα ανώτερα όρια αναφοράς. Συχνά ο όρος χρησιμοποιείται καταχρηστικά ως ταυτόσημος με τον όρο πολυκυτταραιμία, που περιγράφει την αύξηση όλων των κυττάρων του αίματος (ερυθρά αιμοσφαίρια, λευκά αιμοσφαίρια, αιμοπετάλια) (Randolph et al., 2010).

Η ταξινόμηση της ερυθροκυττάρωσης με βάση το μηχανισμό που την προκάλεσε παρουσιάζεται σχηματικά στο παρακάτω διάγραμμα.

Διάγραμμα 1 *: Σχηματική παρουσίαση των μηχανισμών της ερυθροκυττάρωσης.*

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Σχετική ερυθροκυττάρωση λόγω μείωσης του όγκου του πλάσματος από την μετακίνηση υγρών σε κοιλότητες του σώματος έχει διαπιστωθεί σε περιστατικά αγελάδων με περιτονίτιδα που οφειλόταν στην παρουσία ελκών στο ήνυστρο (Braun et al., 2019).

Η απόλυτη αύξηση του αριθμού των ερυθρών αιμοσφαιρίων στο περιφερικό αίμα μπορεί να είναι πρωτογενής ή δευτερογενής. Η πρωτογενής ερυθροκυττάρωση οφείλεται σε έντονο πολλαπλασιασμό των πρόδρομων ερυθρών αιμοσφαιρίων στο μυελό των οστών λόγω διαταραχής της αιμοποίησης, με φυσιολογική ή μειωμένη συγκέντρωση της ερυθροποιητίνης στο αίμα (Randolph et al., 2010). Σε ότι αφορά στα μηρυκαστικά, αναφέρεται περιστατικό μόσχου της φυλής Japanese Black, που σε ηλικία 8 μηνών εμφάνισε μειωμένη όρεξη και στη γενική εξέταση του αίματος διαπιστώθηκε αύξηση του αριθμού των ερυθρών αιμοσφαιρίων και αιματοκρίτη αλλά και ήπια αύξηση της συγκέντρωσης της αιμοσφαιρίνης. Οι ιστολογικές εξετάσεις στο μυελό των οστών, μετά το θάνατο του ζώου, έδειξαν μεγάλη αύξηση των πρόδρομων ερυθρών αιμοσφαιρίων χωρίς νεοπλασματικό πολλαπλασιασμό. Μετά τον αποκλεισμό και τυχόν υποκείμενων αιτιών, καταγράφηκε ως το πρώτο περιστατικό πρωτογενούς ερυθροκυττάρωσης στη φυλή αυτή (Takagi et al., 2006).

Μια άλλη μορφή απόλυτης αύξησης των ερυθρών αιμοσφαιρίων, η οικογενής ερυθροκυττάρωση, έχει περιγραφεί σε μόσχους της φυλής Jersey. Συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε αιματοκρίτης 60- 80%, φυσιολογική συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης στο αίμα και φυσιολογικά αέρια αρτηριακού αίματος αλλά και μη μετρήσιμη ποσότητα ερυθροποιητίνης στο πλάσμα.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Φυσιολογικά, ο αιματοκρίτης των μόσχων αμέσως μετά τη γέννηση μειώνεται μέχρι την ηλικία του ενός μήνα και στη συνέχεια αυξάνεται μέχρι την ηλικία των 2- 3 μηνών, όπου και σταθεροποιείται. Στους μόσχους με οικογενή ερυθροκυττάρωση, η αύξηση του αιματοκρίτη συνεχίστηκε μέχρι την ηλικία των 6-7 μηνών, υπερβαίνοντας το ανώτερο όριο αναφοράς, ενώ διαπιστώθηκε σταδιακή μείωσή του στις επακόλουθες μετρήσεις μέχρι την ηλικία των 20 μηνών (Tennant et al., 1969; Van Dyke et al., 1968).

Στην δευτερογενή ερυθροκυττάρωση, η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης στο πλάσμα είναι αυξημένη, λόγω χρόνιας υποξαιμίας που προκαλείται από διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Σε αυτές περιλαμβάνονται αναπνευστικές και καρδιαγγειακές παθήσεις και οι καρδιαγγειακές ανωμαλίες (Harvey, 2012a). Σε ότι αφορά στα μηρυκαστικά αναφέρεται περιστατικό μόσχου με δευτερογενή ερυθροκυττάρωση 5 μηνών με συγγενή διαμαρτία διάπλασης της καρδιάς και των αγγείων (Trachsel et al., 2010). Δευτερογενής ερυθροκυττάρωση διαπιστώνεται και σε υγιή ζώα που διαβιούν σε μεγάλο υψόμετρο (Harvey, 2012a).

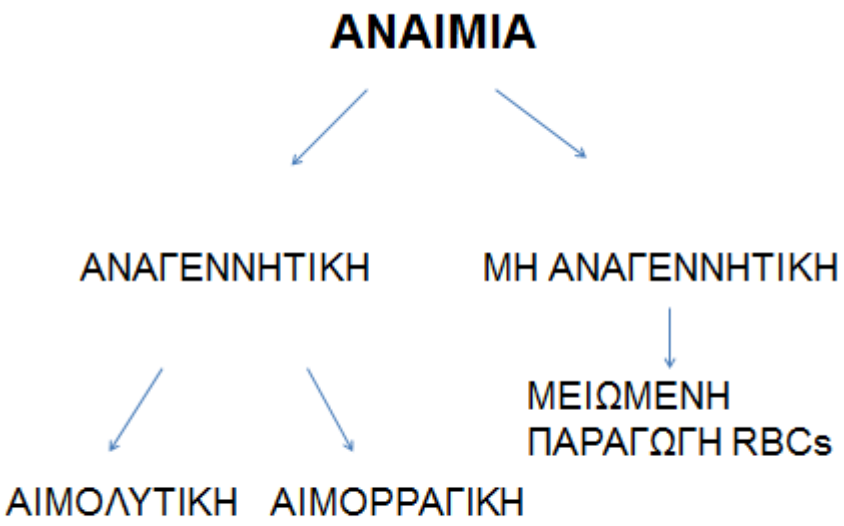
1.2.1.2. Αναιμία

Η αναιμία χαρακτηρίζεται από το μειωμένο αιματοκρίτη, τη μειωμένη μάζα των ερυθρών αιμοσφαιρίων και την μειωμένη συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης που οδηγεί σε μειωμένη ποσότητα οξυγόνου, το οποίο κυκλοφορεί στο αίμα οδηγώντας σε υποξία του ιστού. Στην πράξη η αναιμία καθορίζεται από την

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

αιμοσφαιρίνη που είναι χαμηλότερα από το κατώτατο όριο αναφοράς (Thrall, 2012a).Η ταξινόμηση της αναιμίας φαίνεται στο **Διάγραμμα 2**.

Διάγραμμα 2. *Ταξινόμηση της αναιμίας*



Αναγεννητική αναιμία παρατηρείται κυρίως σε οξεία απώλεια αίματος ή σε αιμολυτική αναιμία, ενώ σπάνια παρατηρείται σε περιπτώσεις όπου η αναιμία οφείλεται σε χρόνιες παθολογικές καταστάσεις ή σε μειωμένη παραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων στο μυελό των οστών (Cebra and Cebra, 1998).

Στον **Πίνακα 2** αναφέρονται οι παράγοντες που προκαλούν αναιμία στα μηρυκαστικά.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Πίνακας 2. *Παράγοντες που προκαλούν αναιμία στα μηρυκαστικά*

	Πρόβατο	Αίγα	Βοοειδές
Εξωπαράσιτα		**Αιμορραγική Αναιμία**	
Linognathus spp			E, N
Ενδοπαράσιτα		**Αιμορραγική Αναιμία**	
Haemonchus concortus	E, N	E	N
Mecistocirrus spp			N
Fasciola hepatica	E, N	E	E, N
Paramphistomum cervi			E, N
Παθογόνοι παράγοντες		**Αιμολυτική Αναιμία**	
Babesia spp	E, N	E	E, N
Theileria spp	Y		E, N
Anaplasma spp	E	E	E, N
Trypanosoma spp	E, N	E	E, N
Mycoplasma spp	E		E
Stephanofilarial sp			E
Leptospira spp	N		E
	Αναιμία λόγω μειωμένης παραγωγής RBCs		
Lumpy skin disease virus			E
Mycoplasma paratuberculosis	E		
Bluetongue virus,	E		
Τοξικοί παράγοντες		**Αιμολυτική Αναιμία**	
Allium spp	E	E	E, N
Brassica spp			E
Ipomoa carnea	E		N
Long-acting oxytetracycline	E		
Χαλκός	N	E	
Ψευδάργυρος	E		
Αρσενικό	E		E
Διοξίνη		E	
	Αναιμία λόγω μειωμένης παραγωγής RBCs		
Χρόνια τοξίκωση			E, N
Διατροφική ανεπάρκεια		**Αιμολυτική Αναιμία**	
Χαλκός	N	N	
Σελήνιο	N		
Φωσφόρος	N		
	Αναιμία λόγω μειωμένης παραγωγής RBCs		
Κοβάλτιο / φολικό οξύ	N	E	
Σίδηρος	E, N		E, N
Γαστρεντερικό σύστημα		**Αιμορραγική Αναιμία**	
C. perfringens type D	N		
C. hemolyticum	E		E

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

	Πρόβατο	Αίγα	Βοοειδές
Αναπνευστικό σύστημα	**Αιμορραγική Αναιμία**		
Θρόμβωση κοιλιακή φλέβας και πνευμονική εμβολή			E
Ουρογεννητικό σύστημα	**Αιμορραγική Αναιμία**		
Ενζωοτική αιματουρία			E
C.renale και *E. coli (*Πυελονεφρίτιδα)			E
Δευτερογενής αναιμία λόγω δυσλειτουργίας ή δυσπλασίας του μυελού των οστών	**Αναιμία λόγω μειωμένης παραγωγής RBCs**		
Νεοπλασία			E
Νεογνική πανκυτταροπενία των βοοειδών			N
Ανοσολογικοί παράγοντες	**Αιμολυτική Αναιμία**		
Εμβολιασμός			E, N
Χορήγηση βόειου πρωτογάλακτος σε αμνό	N	N	
IMHA			E, N
Άλλοι παράγοντες	**Αιμορραγική Αναιμία**		
Τραυματισμοί			E
Νεοπλασία			E, N
Διαταραχές αιμόστασης			E

*Πρόβατο: Νεαρό (N) < 12 μηνών, Ενήλικο (E) >12 μηνών, Αίγα: Νεαρό (N) < 12 μηνών, Ενήλικο (E) >12 μηνών, Βοοειδές: Νεαρό (N) < 12 μηνών, Ενήλικο (E) >12 μηνών.

Οι παράγοντες που σχετίζονται με την πρόκληση αναιμίας αναλύονται με βάση τον παραπάνω πίνακα, ενώ η περιγραφή τους με βάση το είδος της αναιμίας που προκαλείται κάθε φορά γίνεται σε δημοσίευση που πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής (Katsogiannou et al., 2018).

Συχνό αίτιο αναιμίας είναι η έντονη παρασίτωση από εξωπαράσιτα λόγω απώλειας αίματος, όπως έχει καταγραφεί και στα βοοειδή, (Shemanchuk et al., 1960; Stromberg and Guillot, 1987), αλλά και από ενδοπαράσιτα όπως

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

διαπιστώνεται και σε άλλα είδη μηρυκαστικών. Διάφορα παράσιτα εμπλέκονται στην πρόκληση αναιμίας όπως είναι τα νηματώδη, με πιο κοινό το *Haemonchus contortus* στα μικρά μηρυκαστικά (Baldissera et al., 2015; Bordoloi et al., 2012; Vatta et al., 2002) και τις αγελάδες (Favero et al., 2016; Van Aken et al., 1997), καθώς και τα τρηματώδη που περιλαμβάνουν το *Paramphistomum cervi* στα βοοειδή (Dorny et al., 2011) και τη *Fasciola hepatica* στα μικρά (Knight, 1980; Martinez-Moreno et al., 1997; Saleh, 2008) και μεγάλα μηρυκαστικά (Lotfollahzadeh et al., 2008; Ross et al., 1966).

Επιπλέον, υπάρχουν και άλλες παθολογικές καταστάσεις που οδηγούν σε αιμορραγική αναιμία, όπως τα έλκη του ηνύστρου στους αμνούς (Ok et al., 2001; Vatn and Ulvund, 2000) και στα βοοειδή (Peek et al., 2018) και η δυσεντερία του χειμώνα και το σύνδρομο του αιμορραγικού εντέρου στα βοοειδή (Peek et al., 2018). Η δυσεντερία του χειμώνα οφείλεται σε κορωνοϊό και χαρακτηρίζεται από αιμορραγική διάρροια και παρουσία πηγμάτων αίματος στα κόπρανα (Peek et al., 2018). Το σύνδρομο του αιμορραγικού εντέρου είναι ένα υπεροξύ νόσημα των ενήλικων βοοειδών χωρίς πλήρως διευκρινισμένο αίτιο, αν και η επικρατούσα άποψη είναι ότι οφείλεται στο *Clostridium perfringens* type A, που προκαλεί αιμορραγική εντερίτιδα με έντονη απώλεια αίματος (Braun et al., 2010).

Στα μηρυκαστικά, η αναιμία μπορεί να προκληθεί και από αιμοπαράσιτα. Σε αυτά περιλαμβάνονται παθογόνοι παράγοντες που μεταδίδονται με κρότωνες και προσβάλλουν τα ερυθρά αιμοσφαίρια του αίματος όπως είναι η *Babesia* spp στα μικρά (Esmaeilnejad et al., 2012; Yeruham et al., 1998) και τα μεγάλα μηρυκαστικά (Bal et al., 2016; Trueman and Blight, 1978) και η

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Theileria spp στους αμνούς (Alani and Herbert, 1988) και τους μόσχους (Moll et al., 1986; Omer et al., 2002). Κροτωνογενείς παθογόνοι παράγοντες ανευρίσκονται και στα λευκά αιμοσφαίρια και ειδικότερα οι ρικέτσιες, κυρίως του γένους *Anaplasma* που εντοπίζονται έως και στο 90% των κοκκιοκυττάρων των προβάτων (Yasini et al., 2012), των αιγών (Ahmadi-hamedani et al., 2012) και των βοοειδών (Ashuma et al., 2013; Henniger et al., 2013), στο μέγιστο της βακτηριαιμίας. Άλλα παράσιτα του αίματος που οδηγούν σε αναιμία είναι τα πρωτόζωα, όπως το τρυπανόσωμα (*Trypanosoma sp)* (Anosa et al., 1992; Biryomumaisho et al., 2013; Katunguka-Rwakishaya et al., 1997) και κυρίως τα είδη του μυκοπλάσματος (*Mycoplasma* spp) (Genova et al., 2011; Suzuki et al., 2011), που μπορούν να παρατηρηθούν εκτός και εντός των κυττάρων του αίματος, αντίστοιχα. Επιπλέον, οι *νύμφες* του νηματώδους *Stephanofilarial stilesi* εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος, αυξάνουν την ευθραυστότητα των ερυθρών αιμοσφαιρίων προκαλώντας αναιμία (Singh et al., 2011).

Το *Clostridium perfringens* type D, μπορεί να οδηγήσει σε εμφάνιση αιμολυτικής αναιμίας στους αμνούς, λόγω των τοξινών που παράγονται από το μικροοργανισμό, προκαλώντας την εντεροτοξιναιμία τύπου D (νόσο του πολτώδους νεφρού, yellow lamb disease) (Giannitti et al., 2014). Αντίστοιχα, εμφανίζεται αιμολυτική αναιμία στα πρόβατα και τα βοοειδή από τη δράση των τοξινών του *Clostridium hemolyticum,* προκαλώντας τη βακιλική αιμοσφαιρινουρία (Randhawa et al., 1995; Takagi et al., 2009*)*.

Η *Leptospira interrogans* προκαλεί αλλοιώσεις το ενδοθήλιο των μικρών αιμοφόρων αγγείων, λόγω της βακτηριαιμίας, οι οποίες οδηγούν σε ισχαιμία

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

διαφόρων οργάνων, κυρίως όμως των νεφρών και του ήπατος. Εκτός από την αγγειίτιδα που προκαλείται, οι αιμολυσίνες της *Leptospira sp* εμπλέκονται και στην παθογένεια της αναιμίας. Φαίνεται ότι είναι υπεύθυνες για τη δημιουργία οπών στην κυτταρική μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων των βοοειδών (Lee et al., 2002), οδηγώντας σε αιμόλυση.

Άλλη κατηγορία παραγόντων που οδηγούν σε αιμολυτική αναιμία στα μηρυκαστικά είναι οι τοξικώσεις. Αυτές μπορεί να οφείλονται στην κατανάλωση φυτών, όπως της οικογενείας *Allium spp* που περιλαμβάνει το κρεμμύδι και το σκόρδο (Aslani et al., 2005; Heidarpour et al., 2013; Rae, 1999), της οικογένειας *Brassica spp* με πιο γνωστά το μπρόκολο και το λάχανο (Xu, 1992) καθώς και ένα καλλωπιστικό φυτό, το *Ipomoea carnea*, (Tartour et al., 1973).

Αιμολυτική αναιμία αναφέρεται και σε περιστατικό τοξίκωσης από τη χορήγηση σκευάσματος οξυτετρακυκλίνης μακριάς δράσης (long acting oxytetracycline). Ωστόσο, παρά την ευρεία χρήση του σκευάσματος στην κτηνιατρική, αναφέρονται τοξικώσεις μόνο σε πειραματικές μελέτες. Φαίνεται ότι η οξυτετρακυκλίνη μπορεί να διαπεράσει τα ερυθρά αιμοσφαίρια και να αλληλεπιδράσει με την αιμοσφαιρίνη, οδηγώντας σε σημαντική μείωση του αριθμού των ερυθρών αιμοσφαιρίων και της συγκέντρωσης της αιμοσφαιρίνης (Chi et al., 2010).

Επιπλέον, η αυξημένη συγκέντρωση βαρέων μετάλλων όπως ο χαλκός (Bundza et al., 1982; Cregar et al., 2012; Stogdale, 1978), ο ψευδάργυρος (Allen et al., 1983) και το αρσενικό (Keshavarzi et al., 2015; Rana et al., 2010)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

στον οργανισμό των μηρυκαστικών μπορούν να οδηγήσουν σε αιμολυτική αναιμία λόγω φυσικής τοξίκωσης ή από διοξίνες στις αίγες (Fouzy et al., 2007) λόγω πειραματικής πρόκλησης τοξίκωσης.

Ο μόλυβδος έχει αναφερθεί ότι έχει προκαλέσει αιμολυτική αναιμία σε αγελάδα λόγω δηλητηρίασης (Schlerka et al., 2004), αλλά πειραματική χορήγησή του σε χαμηλή δόση σε πρόβατα δεν είχε το ίδιο αποτέλεσμα (Polizopoulou, 1991).

Από την άλλη πλευρά, η διατροφική ανεπάρκεια σε χαλκό και σελήνιο έχει συσχετισθεί στους αμνούς με σχηματισμό σωμάτων Heinz, που είναι ενδεικτικό της οξειδωτικής βλάβης των ερυθρών αιμοσφαιρίων, και κατά συνέπεια της αιμολυτικής αναιμίας. Επιπλέον, η έντονη άσκηση φαίνεται να επιδεινώνει την αιματολογική εικόνα που οφείλεται στην έλλειψη αυτών των ιχνοστοιχείων (Draksler et al., 2002; Suttle et al., 1987). Επίσης, έχει αναφερθεί αναιμία με παρουσία σωματίων Heinz σε αγελάδες με ανεπάρκεια φωσφόρου (Jubb et al., 1990).

Η ανεπάρκεια άλλων θρεπτικών συστατικών, μπορεί επίσης να οδηγήσει σε αναιμία, όπως στην περίπτωση της μειωμένης πρόσληψης του κοβαλτίου. Αυτή η ανεπάρκεια οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων, λόγω της επακόλουθης ανεπάρκειας της βιταμίνης Β12, που συντίθεται υπό φυσιολογικές συνθήκες στη μεγάλη κοιλία των μηρυκαστικών χρησιμοποιώντας το κοβάλτιο. Η βιταμίνη Β12 φυσιολογικά δρα ως συνεργικός παράγοντας σε διάφορα ενζυμικά συστήματα που προάγουν τη σύνθεση των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Στην περίπτωση των προβάτων, έχει

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

αναφερθεί ότι η νόσος του ωχρού ήπατος (white liver disease) που οφείλεται είτε στην ανεπάρκεια της βιταμίνης B12 είτε σε ηπατοτοξικότητα σχετίζεται με μειωμένη συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης (Ulvund, 1990). Παρόμοια ευρήματα έχουν αναφερθεί και σε ανεπάρκεια κοβαλτίου σε αίγες (Al-Habsi et al., 2007).

Η ανεπάρκεια θρεπτικών στοιχείων μπορεί να μην οφείλεται μόνο στη μειωμένη πρόσληψή τους αλλά και σε υποκείμενο νόσημα, όπως στην περίπτωση του σιδήρου. Ανεπάρκεια σιδήρου παρατηρείται κυρίως σε νεαρά ζώα, λόγω της γρήγορης ανάπτυξής τους και των αυξημένων αναγκών για την παραγωγή αιμοσφαιρίνης, μυοσφαιρίνης και άλλων ενώσεων που περιλαμβάνουν σίδηρο (Green et al., 1997) και σε προβατίνες μετά τον τοκετό (Cihan et al., 2016) αλλά η πιο συχνή αιτία είναι ο παρασιτισμός από ένδο- και έξω- παράσιτα (Singh et al., 2014). Ακόμα, ο σίδηρος εμπλέκεται στη παθογένεια της αναιμίας της χρόνιας νόσου. Παρόλο που δεν υπάρχουν απώλειες σε σίδηρο και φυσιολογικά υπάρχει σε επαρκείς συγκεντρώσεις στον οργανισμό για την ερυθροποίηση, δεσμεύεται από φλεγμονικές ουσίες στο μυελό των οστών και δεν είναι διαθέσιμος για την αιμοποίηση οδηγώντας σε αναιμία λόγω μειωμένης παραγωγής (Radostits et al., 2006).

Αναιμία του χρόνιου νοσήματος έχει παρατηρηθεί σε βοοειδή με οζώδη δερματίτιδα , που λόγω της χρόνιας φλεγμονώδους αντίδρασης στην λοίμωξη από τον ιό *Capripoxvirus*, εγκλωβίστηκε ο σίδηρος στο μυελό των οστών και διαταράχθηκε η αιμοποίηση Έτσι, η αναιμία είναι συνήθως ήπια και αναγεννητική με αργό ρυθμό (Abutarbush, 2015). Αντίστοιχα, και η παραφυματίωση των προβάτων σχετίζεται με ήπια αναιμία λόγω χρόνιας φλεγμονής (Hemalatha et al., 2013). Παρόλο που η αναιμία δεν είναι συχνό

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

εύρημα σε περιστατικά προβάτων που έχουν προσβληθεί από τον ιό του καταρροϊκού πυρετού (Bluetongue), υπάρχουν αναφορές περιστατικών με αναιμία είτε λόγω αγγειίτιδας που προκαλείται από τον ιό είτε λόγω της χρονιότητας της νόσου (Vasileiou et al., 2016).

Η αναιμία μπορεί ακόμα να προκληθεί λόγω θρόμβωσης της οπίσθιας κοίλης φλέβας στα ενήλικα βοοειδή η οποία κλινικά γίνεται αντιληπτή με ωχρότητα βλεννογόνων, αιμόπτυση και επίσταξη (Breeze et al., 1976). Νεοπλάσματα της ουροδόχου κύστης που εμφανίζονται δευτερογενώς λόγω χρόνιας τοξίκωσης από κατανάλωση φτέρης οδηγούν σε απώλεια αίματος μέσω της ουρογεννητικής οδού που εκδηλώνεται με αιματουρία. Απώλεια αίματος από το ουροποιητικό παρατηρείται σε ενζωοτική αιματουρία (McKenzie, 1978) καθώς και σε πυελονεφρίτιδα που προκαλείται από τα βακτήρια *Corynebacterium renale* και *Escherichia coli* στις αγελάδες (Braun et al., 2008).

Επιπλέον, οξεία απώλεια αίματος, μπορεί να είναι αποτέλεσμα μαιευτικών χειρισμών, κυρίως σε αγελάδες κατά τον τοκετό μετά από πολύωρη προσπάθεια (Radostits et al., 2006). Ακόμα η αναιμία μπορεί να οφείλεται σε νεοπλάσματα (Stock et al., 2011), όπως σε ρήξη όγκου της ωοθήκης που οδηγεί σε αιμοπεριτόνιο ή σε ρήξη του σπλήνα ύστερα από διήθηση από λεμφοσάρκωμα (Peek et al., 2018), αν και είναι σπάνιο στις αγελάδες (Masseau et al., 2004).

Η συλλογή αίματος στην κοιλιακή κοιλότητα οφείλεται συνήθως σε αιμοστατικές διαταραχές (Radostits et al., 2006). Εσωτερικές αιμορραγίες που

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

οφείλονται σε θρομβοκυτταροπενία έχουν αποδοθεί στον ιό που προκαλεί την Ιογενή Διάρροια των Βοοειδών (Bovine Virus Diarrhea, BVD) (Dabak et al., 2007). Αναφέρονται, επίσης, αιφνίδιοι θάνατοι σε αμνούς, ύστερα από κατανάλωση μυοκτόνων ουσιών, αφού είχαν παρουσιάσει προηγουμένως επίσταξη, αναπνευστική δυσχέρεια και οίδημα σε διάφορα σημεία του σώματός τους, λόγω διαταραχών της δευτερογενούς αιμόστασης (Del Piero and Poppenga, 2006).

Εκτός από την φλεγμονή και η νεοπλασία συνδέεται με αναιμία της χρόνιας νόσου. Τοξίκωση από την κατανάλωση φτέρης (braken fern), κυρίως στις αγελάδες αλλά και στα πρόβατα οδηγούν στην ανάπτυξη νεοπλασιών με συνέπεια την εμφάνιση αναιμίας της χρόνιας νόσου. Στη μικροσκοπική εξέταση του μυελού των οστών των ζώων αυτών διαπιστώθηκε απλασία των αιμοποιητικών κυττάρων (Prakash et al., 1996). Μυελόφθιση δηλαδή αντικατάσταση του μυελού των οστών από νεοπλασματικά ή φλεγμονικά κύτταρα διαπιστώθηκε σε περιστατικό αγελάδας με αιμοφαγοκυτταρικό ιστιοκυτταρικό σάρκωμα, στο οποίο τα κακοήθη ιστιοκύτταρα πολλαπλασιάστηκαν αρχικά στον σπλήνα και στη συνέχεια στον μυελό των οστών (Matsuda et al., 2010). Πρόσφατα διαπιστώθηκε στους μόσχους η νεογνική πανκυτταροπενία των βοοειδών (Bovine Neonatal Pancytopenia), σύνδρομο στο οποίο ο μυελός των οστών είναι απλαστικός και τα αιμοποιητικά κύτταρα έχουν αντικατασταθεί από λιπώδη κύτταρα (Fukunaka et al., 2010).

Αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία σπάνια αναφέρεται σε νεαρά μηρυκαστικά, ενώ έχει εμφανιστεί σε αγελάδα ύστερα από χορήγηση του πολυδύναμου

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

εμβολίου για το *Clostridium botulinum* (Yeruham et al., 2003). Ομοίως, αντιγόνα από το εμβόλιο του BVD φαίνεται να προκαλούν την παραγωγή αντισωμάτων που συνδέονται όχι μόνο στα κύτταρα του αίματος στην περιφερική κυκλοφορία αλλά και στα βλαστικά κύτταρα του μυελού των οστών στα νεογνά (Deutskens et al., 2011). Αυτά τα αντιγόνα διευκολύνουν την φαγοκυττάρωση των προσβεβλημένων κυττάρων μέσω της οψονινοποίησης. Μετά τον εμβολιασμό κατά της Οζώδους Δερματίτιδας των Βοοειδών (Lumpy Skin Disease Virus) αναφέρθηκε ήπια αναγεννητική αναιμία, πιθανώς λόγω ήπιας αιμόλυσης (Katsoulos et al., 2018). Ανοσολογικής αιτιολογίας αιμολυτική αναιμία έχει αναφερθεί σε νεογέννητους αμνούς που έλαβαν πρωτόγαλα αγελάδας (Winter and Clarkson, 1992), ενώ η ιδιοπαθής ανοσολογικής αιτιολογίας αναιμία έχει διαγνωσθεί ύστερα από τον αποκλεισμό όλων των παραπάνω παραγόντων πρόκλησης αιμόλυσης (Nassiri et al., 2011).

1.2.2. Λευκά Αιμοσφαίρια

1.2.2.1. Λευκοκυττάρωση

Φυσιολογικοί και παθολογικοί παράγοντες επιδρούν στο σύνολο ή στα επιμέρους είδη λευκών αιμοσφαιρίων. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η άσκηση και οι συνθήκες καταπόνησης επηρεάζουν τις τιμές των αιματολογικών παραμέτρων, ειδικότερα σε ότι αφορά τα ουδετερόφιλα. Η αύξηση του αριθμού τους στις παραπάνω καταστάσεις είναι αποτέλεσμα είτε άμεσης

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

απελευθέρωσης κατεχολαμινών είτε ενδογενούς ή εξωγενούς αύξησης της συγκέντρωσης των γλυκοκορτικοστεροειδών στο αίμα. Στις παραπάνω περιπτώσεις, η ουδετεροφιλία παρέρχεται μετά την πάροδο λίγων λεπτών μέχρι μερικών ωρών (Harvey, 2012b).

Υποξείες ή χρόνιες λοιμώξεις από βακτήρια και φλεγμονές προκαλούν αξιοσημείωτη αύξηση των ουδετεροφίλων, όπως για παράδειγμα σε πρόβατο με πυομήτρα από *E. coli* (Castillo et al., 2018). Σε πειραματική πρόκληση μαστίτιδας με *E. coli* σε αγελάδες, διαπιστώθηκε ουδετεροφιλία με παρουσία άωρων ουδετεροφίλων (κλίση ή εκτροπή προς τα αριστερά). Η κλίση αριστερά υποδηλώνει είτε ανταπόκριση του οργανισμού σε υπάρχουσα ουδετεροπενία είτε προσπάθεια αύξησης του αριθμού των ουδετεροφίλων στο περιφερικό αίμα, χωρίς όμως να έχουν προλάβει να ωριμάσουν, σε νέα σοβαρή φλεγμονή, όπως φάνηκε μετά από πειραματική μόλυνση με το βακτήριο *E. coli*, σε αγελάδες, προκαλώντας τους μαστίτιδα. Σημειώνεται ότι η αύξηση των άωρων ουδετεροφίλων ήταν ανάλογη της σοβαρότητας της μαστίτιδας(Kremer et al., 1993). Η ουδετεροφιλία αντίθετα, με την παρουσία κυρίως ώριμων ουδετεροφίλων υποδηλώνει χρόνια φλεγμονή. Σε βοοειδή της της φυλής Holstein έχει αναφερθεί ανεπάρκεια προσκόλλησης των λευκών αιμοσφαιρίων (Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency). Πρόκειται για αυτοσωμικό υπολειπόμενο κληρονομικό νόσημα που οφείλεται σε μετάλλαξη γονιδίου σχετιζόμενου με την ιντεγκρίνη β2. Το νόσημα αυτό χαρακτηρίζεται από επαναλαμβανόμενες βακτηριακές λοιμώξεις και επίμονη ουδετεροφιλία (Nagahata, 2004).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Οι κύριες παθολογικές καταστάσεις που επηρεάζουν τον αριθμό των εωσινοφίλων είναι οι παρασιτώσεις και οι αντιδράσεις υπερευαισθησίας τύπου ΙΙ που συνοδεύονται από ενεργοποίηση των $CD4^+$ τύπου 2 Τ-βοηθητικών λεμφοκυττάρων (Harvey, 2012b). Μαζί με την εωσινοφιλία μπορεί σπάνια να συνυπάρξει και αύξηση του απόλυτου αριθμού των βασίφιλων, τα οποία σπάνια εμφανίζουν μεμονωμένη αύξηση.

Αν και είναι γνωστός ο ρόλος των βασίφιλων στην παραγωγή της αγγειοκινητικής ουσίας, ισταμίνης, και της αντιπηκτικής ουσίας, ηπαρίνης, οι παράγοντες που επηρεάζουν τον αριθμό τους είναι συνήθως οι ίδιοι που προκαλούν και εωσινοφιλία (Harvey, 2012b).

Οι χρόνιες λοιμώξεις από ιούς και βακτήρια είναι οι σημαντικότεροι παράγοντες που προκαλούν λεμφοκυττάρωση. Ωστόσο, η αύξηση συνήθως είναι μικρή. Ο ιός της ιογενούς λευχαιμίας των βοοειδών προκαλεί σημαντική αύξηση των λεμφοκυττάρων (Bovine Leukemia Virus) (Pandey et al., 2017) αν και παρατηρείται σε ένα ποσοστό μικρότερο του 30% των περιστατικών (Roland et al., 2014).

Έντονη καταπόνηση και φλεγμονικές καταστάσεις λοιμώδους ή μη αιτιολογίας, ανεξαρτήτως της χρονιότητας σχετίζονται με αύξηση των μονοκυττάρων. Σε μία πρόσφατη μελέτη σε απογαλακτισμένους μόσχους, διαπιστώθηκε συσχέτιση μεταξύ της μονοκυττάρωσης και της παρουσίας διάρροιας οφειλόμενης σε κορωνοϊό (Chae et al., 2019).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

1.2.2.2. Λευκοπενία

Αντίστοιχα με τη λευκοκυττάρωση, διάφορες παθολογικές καταστάσεις μπορεί να επιδράσουν στο σύνολο ή σε επιμέρους είδη λευκών αιμοσφαιρίων του αίματος, προκαλώντας τη μείωσή τους.

Οξεία τοπική φλεγμονώδης αντίδραση μπορεί να προκαλέσει μαζική μεταφορά των λευκών αιμοσφαιρίων του περιφερικού αίματος στην προσβεβλημένη περιοχή και να οδηγήσει σε παροδική λευκοπενία, όπως σε αγελάδες με έλκη στο ήνυστρο που παρουσίασαν περιτονίτιδα (Braun et al., 2019) και σε αγελάδες με επιλόχεια μητρίτιδα (Gundlach et al., 2017). Η πειραματική χορήγηση μυκοτοξίνης Τ-2 σε αμνούς, η οποία μπορεί να παραχθεί από διάφορους μύκητες (π.χ. *Fusarium, Myrothecium, Trichothecium, Trichoderma, Cephalosporium, Verticimonosporium* και *Stachybotrys)* προκάλεσε, επίσης, λευκοπενία (Friend et al., 1983). ΄

Δηλητηρίαση από μυκοτοξίνες σε αγελάδες προκάλεσε λευκοπενία σε συνδυασμό με θρομβοκυτταροπενία (Jeffers and Lenghaus, 1986). Η λευκοπενία εμφανίζεται και ως μέρος της πανκυτταροπενίας λόγω καταστολής της λειτουργίας του μυελού των οστών, του σπλήνα και των λεμφογαγγλίων και διαπιστώνεται κυρίως σε τοξικώσεις.

Η ουδετεροπενία εμφανίζεται και ως ανταπόκριση του οργανισμού σε τοξαιμικές καταστάσεις, κυρίως σε ενδοτοξιναιμία, όπου ουδετερόφιλα μεταφέρονται από την κυκλοφορία του αίματος στους ιστούς. Ο μηχανισμός αυτός διαπιστώθηκε ύστερα από πειραματική χορήγηση λιποπολυσακχαριτών

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

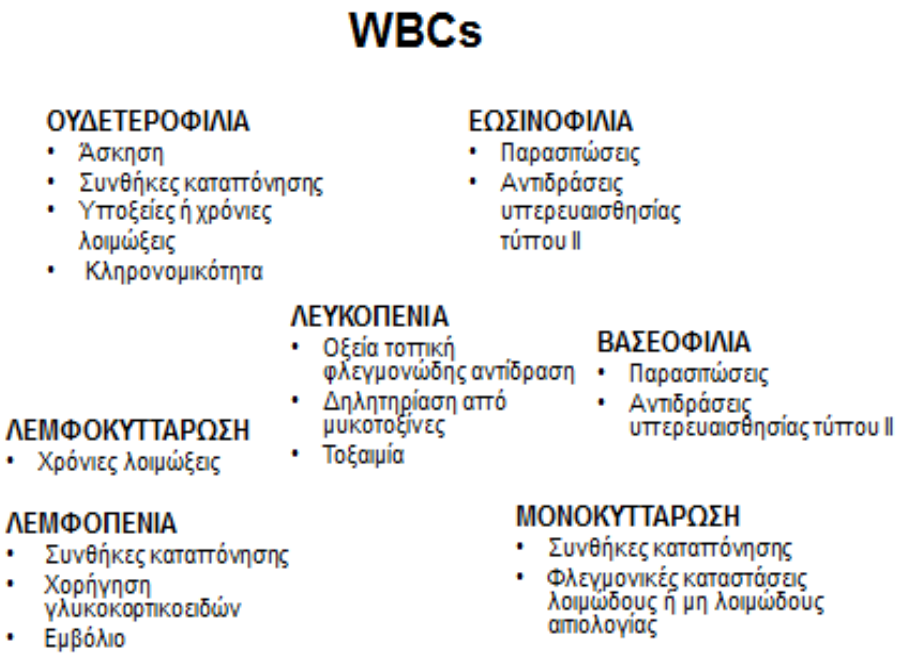
σε αίγες. Οι λιποπολυσακχαρίτες είναι μεγάλα μόρια που βρίσκονται προσκολλημένα στο κυτταρικό τοίχωμα των gram (-) βακτηρίων και λειτουργούν ως ενδοτοξίνες προκαλώντας αλλεργικές αντιδράσεις στους ιστούς. Οι αίγες αυτές εμφάνισαν οξεία σηψαιμία εντός μίας ώρας από την χορήγησή τους, με πυρετό και λευκοπενία (Salvesen et al., 2016).

Η λεμφοπενία εμφανίζεται σε ανταπόκριση του οργανισμού σε καταστάσεις καταπόνησης ή χορήγηση γλυκοκορτικοειδών μαζί με μείωση του αριθμού των εωσινοφίλων, όπως παρατηρήθηκε πειραματικά σε μία αγελάδα (Anderson et al., 1999). Η χορήγηση εμβολίων έχει ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση λεμφοπενίας. Για παράδειγμα, διαπιστώθηκε ύστερα από πειραματική χορήγηση του εμβολίου του Hobi-like virus (HobiPeV), της οικογένειας *Flaviviridae,* σε αγελάδες (Jardim et al., 2018).

Η απουσία εωσινοφίλων ή βασίφιλων στο περιφερικό αίμα διαπιστώνεται σε υγιή ζώα και συνεπώς η μείωση του αριθμού τους δεν αποτελεί παθολογικό εύρημα (Pohlman, 2010; Young and Meadows, 2010).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Διάγραμμα 3. *Παράγοντες που προκαλούν μεταβολές στον αριθμό των WBCs και των επιμέρους ειδών κυττάρων.*



1.2.3. Αιμοπετάλια

Φυσιολογικοί και παθολογικοί παράγοντες προκαλούν αύξηση του αριθμού των αιμοπεταλίων (θρομβοκυττάρωση), μείωση του αριθμού τους (θρομβοκυτταροπενία) αλλά και διαταραχές στη δομή και τη λειτουργία τους.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

1.2.3.1. Θρομβοκυττάρωση

Η έντονη καταπόνηση και η έκκριση αδρεναλίνης είναι φυσιολογικοί παράγοντες που σχετίζονται με την εμφάνιση πρωτογενούς θρομβοκυττάρωσης. Σπανίως στα παραγωγικά ζώα διαπιστώνεται πρωτογενής θρομβοκυττάρωση που οφείλεται σε μυελοϋπερπλαστική δυσλειτουργία (Radostits et al., 2006). Σε συστηματικά φλεγμονώδη νοσήματα και λοιμώξεις με διάρκεια αρκετών ημερών ή και εβδομάδων, διαπιστώνεται δευτερογενής (ή αντιδραστική) θρομβοκυττάρωση. Γενικότερα, σε περίπτωση θρομβοκυττάρωσης συστήνεται ο έλεγχος του ζώου για χρόνια λοίμωξη. Η κατανάλωση λάχανου (*Brassica* sp) αναφέρεται ως παράγοντας που σχετίζεται με την εμφάνιση της θρομβοκυττάρωσης στις αγελάδες σε συνδυασμό με αναιμία και παρουσία σωματίων Heinz στο επίχρισμα του αίματος (Radostits et al., 2006).

1.2.3.2. Θρομβοκυτταροπενία

Η τοξίκωση από την κατανάλωση φυτών, όπως το *Pteridium* spp (braken fern) από τα βοοειδή (Xu, 1992) ή *Cheilanthes seiberi* από τα βοοειδή και τα πρόβατα προκαλούν μειωμένη παραγωγή των αιμοπεταλίων (Clark and Dimmock, 1971). Ακόμα, η κατανάλωση μυκοτοξινών που παράχθηκαν από τον μύκητα *Stachybortys* spp από βοοειδή μπορεί να προκαλέσει μείωση της παραγωγής των αιμοπεταλίων (Jeffers and Lenghaus, 1986). Το ίδιο διαπιστώνεται και σε χρόνια τοξίκωση από φάρμακα, όπως η φουραζολιδόνη

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

(furazolidone) σε βοοειδή, η τοξίκωση από τη χρήση τριχλωροαιθυλενίου για την εκχύλιση της σόγιας (Radostits et al., 2006). Επίσης, ύστερα από χορήγηση φαρμάκων που προκαλούν καταστολή του μυελού των οστών, όπως το κοκκιοστατικό Amprolium σε νεογέννητους αμνούς, όπου παρατηρήθηκαν αιμορραγίες, εγκεφαλοπάθειες και διάρροιες (Morgan et al., 1975). Σε οικογενείς παθολογικές καταστάσεις διαπιστώνεται μυελόφθιση σχετιζόμενη με δυσπλασία του μυελού ή μυελοϊνωση, στην οποία συνυπάρχουν θρομβοκυτταροπενία αναιμία και λευκοπενία, όπως σε περιστατικά αιγών με οικογενή μυελοίνωση (Radostits et al., 2006).

Σε αγελάδες διαφόρων ηλικιών περιγράφεται αγνώστου αιτιολογίας κοκκιοκυτταροπενικό σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από έντονη αιμορραγική διάθεση, αυξημένη θνησιμότητα, σε συνδυασμό με βακτηριακές λοιμώξεις και έντονη λευκοπενία (Radostits et al., 2006).

Σε νοσήματα του γαστρεντερικού καθώς και σε φλεγμονές και λοιμώξεις από πλήθος ιών, βακτηρίων και ρικετσιών. Ο ιός της BVD τύπου 2 φαίνεται ότι προκαλεί εντονότατη θρομβοκυτταροπενία (< 5000PLTs/μl) με επακόλουθο την εμφάνιση αιμορραγιών τόσο σε μόσχους (Corapi et al., 1990) όσο και σε αγελάδες (Rebhun et al., 1989).

Ο ιός της Οζώδους Δερματίτιδας προκαλεί τόσο θρομβοκυτταροπενία λόγω διάχυτης αγγειίτιδας και κατανάλωσης των αιμοπεταλίων όσο και συνδυασμένες διαταραχές της αιμόστασης και κυρίως αυξημένη κατανάλωση των αιμοπεταλίων λόγω ΣΔΕΠ (Abutarbush, 2015).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Ο ιός *Phlebovirus* sp της οικογένειας *Bunyaviridae* σχετίζεται με την εμφάνιση συνδρόμου με υψηλό πυρετό και θρομβοκυτταροπενία (Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome, SFTS), σε βοοειδή, πρόβατα (Niu et al., 2013) και αίγες (Liang et al., 2014), στην Κίνα. Τα ζώα εμφάνισαν συμπτώματα από το γαστρεντερικό τους, θρομβοκυτταροπενία και λευκοπενία, ενώ σε σοβαρότερες περιπτώσεις νευρολογικά συμπτώματα, αιμορραγίες, ΣΔΕΠ και πολυοργανική ανεπάρκεια. Ο ιός αυτός μεταδίδεται με κρότωνες σε ζώα και ανθρώπους και συνοδεύεται από υψηλά ποσοστά θνησιμότητας.

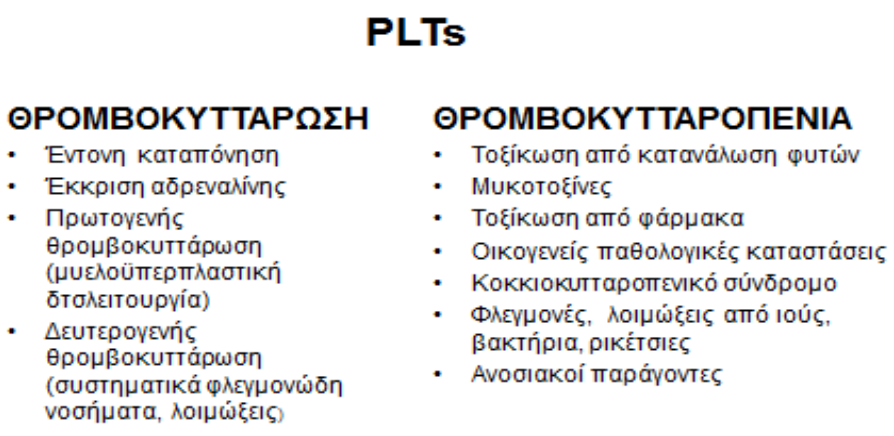
Το *Trypanosoma vivax* είναι ένας ακόμα παθογόνος παράγοντας που προκαλεί θρομβοκυτταροπενία σε μόσχους. Οι μηχανισμοί που οδηγούν σε θρομβοκυτταροπενία είναι αρχικά η φαγοκυττάρωση των αιμοπεταλίων, στη συνέχεια η δημιουργία συσσωματωμάτων αιμοπεταλίων και πιθανώς το ΣΔΕΠ (Anosa et al., 1992). Σε πειραματική μόλυνση αμνών με το *Trypanosoma congolense,* διαπιστώθηκε θρομβοκυτταροπενία, η οποία μάλιστα ήταν εντονότερη σε αμνούς της φυλής Scottish Blackface σε σχέση με αμνούς της φυλής Finn Dorset και συνοδεύονταν από έντονη αναιμία και υποπρωτεϊναιμία (Katunguka-Rwakishaya et al., 1997).

Το *Anaplasma phagocytophilum* έχει αναφερθεί ότι προκαλεί θρομβοκυτταροπενία ύστερα από πειραματική μόλυνση στα μηρυκαστικά (Woldehiwet, 2010). Άλλοι παθογόνοι παράγοντες που σχετίζονται με θρομβοκυτταροπενία στους μόσχους είναι η *Theileria annulata,* ο ιός της Ιογενούς Λευχαιμίας των Βοοειδών (Bovine Leukemia Virus, BLV), η Salmonella sp και η Sarcocystis sp (Radostits et al., 2006).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Ανοσολογικοί παράγοντες ενέχονται στην εμφάνιση θρομβοκυτταροπενίας και ειδικότερα σε νεογέννητους αμνούς ύστερα από κατανάλωση αγελαδινού πρωτογάλακτος, με αποτέλεσμα εμφάνισης εκτεταμένων αιμορραγιών θάνατο μέσα σε δύο μέρες (Schreuder, 1993). Αυτοάνοση θρομβοκυτταροπενία, μπορεί να εμφανιστεί και σε ενήλικες αγελάδες χωρίς ενδείξεις ΣΔΕΠ καθώς οι χρόνοι προθρομβίνης και θρομβοπλαστίνης είναι φυσιολογικοί. Επίσης έχει αναφερθεί αυτοάνοση θρομβοκυτταροπενία ύστερα από χορήγηση πολυδύναμου εμβολίου για την αλλαντίαση σε ταύρο ηλικίας 10 μηνών και σε ενήλικη αγελάδα. Τέλος, έχει αναφερθεί θρομβοκυτταροπενία λόγω χορήγησης κορτικοστεροειδών σε 2 μόσχους, η οποία εκδηλώθηκε με υποδόρια αιματώματα και επίσταξη (Radostits et al., 2006).

Διάγραμμα 4. *Παράγοντες που προκαλούν μεταβολές στον αριθμό των PLTs*



Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

1.2.4. Μορφολογικές ανωμαλίες και Έγκλειστα κυττάρων

1.2.4.1. Ερυθρά αιμοσφαίρια

Φυσιολογικοί και παθολογικοί παράγοντες προκαλούν μεταβολές στη μορφολογία των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Σε αναγεννητική αναιμία διαπιστώνεται ανισοκυττάρωση, δηλαδή παρουσία κυττάρων διαφορετικής διαμέτρου. Ωστόσο, η ανισοκυττάρωση είναι φυσιολογική στα βοοειδή (Thrall, 2012b), όπως επίσης και η ποικιλομορφία στο σχήμα των ερυθρών αιμοσφαιρίων ή αλλιώς ποικιλοκυττάρωση, ιδιαίτερα στα νεαρά μηρυκαστικά (Thrall, 2012b).

Σφάλματα τεχνικής σχετίζονται με την παρουσία ερυθρών αιμοσφαιρίων με ακτινοειδείς προεκβολές, των εχινοκυττάρων. Η παρουσία δρεπανοκυττάρων, αναφέρεται στα ελάφια και τις αίγες της φυλής Angora και επηρεάζεται από την έκθεση σε αυξημένο οξυγόνο ή σε pH μεταξύ 7,6 και 7,8 (Barger, 2010).

Νοσήματα του ήπατος σχετίζονται με την παρουσία ακανθοκυττάρων στο αίμα. Σε νεαρές αίγες είναι αποτέλεσμα της παρουσίας αιμοσφαιρίνης τύπου C στα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης (Thrall, 2012b), ενώ σε βοοειδή έχουν παρατηρηθεί μαζί με σφαιροκύτταρα σε μόλυνση από *Theileria* spp και υποψία συνύπαρξης νοσήματος του ήπατος (Stockham et al., 2000). Σφαιροκύτταρα, εμφανίζονται σε περιπτώσεις όπως προαναφέρθηκε, αιμοπαρασιτώσεων από *Theileria spp* (Stockham et al., 2000) και *Anaplasma spp.* (Thrall, 2012b), σε αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία σε βοοειδή (Nassiri et al., 2011) ή σε τοξίκωση από ψευδάργυρο σε αμνούς (Bundza et al., 1982).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Μπορεί, όμως να οφείλεται και σε κληρονομικά αίτια όπως διαπιστώθηκε σε αγελάδες (Inaba et al., 1996).

Σχιστοκύτταρα παρατηρούνται λόγω φυσικής καταστροφής των ερυθρών αιμοσφαιρίων από αιμοπαράσιτα, όπως το *Trypanosoma* spp και το *Mycoplasma* spp (Anosa et al., 1992; Gladden et al., 2015) αλλά και σε αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία (IMHA) σε αγελάδες (Irmak et al., 2006). Άλλη μορφολογική ανωμαλία των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι η έκκεντρη μετακίνηση της αιμοσφαιρίνης, με αποτέλεσμα την παρουσία εκκεντροκυττάρων. Η κατανάλωση κρεμμυδιών σχετίστηκε, επίσης, με την εμφάνιση εκκεντροκυττάρων στις αίγες και οξειδωτική βλάβη της αιμοσφαιρίνης (Heidarpour et al., 2013), ενώ σε πρόβατα και βοοειδή παρατηρήθηκαν σωμάτια Heinz στο κυτταρόπλασμα των ερυθρών αιμοσφαιρίων (Aslani et al., 2005), και επιπλέον στα βοοειδή σωμάτια Howell- Jolly (Rae, 1999).

Η υποφωσφαταιμία κατά την περιγεννητική περίοδο σε γαλακτοπαραγωγικές αγελάδες (Jubb et al., 1990), η ανεπάρκεια σεληνίου σε βοοειδή (Morris et al., 1984) και η ανεπάρκεια κοβαλτίου σε αμνούς (Suttle et al., 1987) συνδέεται επίσης με την παρουσία σωματίων Heinz. Τα ίδια έγκλειστα διαπιστώνονται σε τοξίκωση από κρεμμύδια στα πρόβατα και τις αγελάδες (Aslani et al., 2005; Rae, 1999) και σε χάλκωση των αιγών (Cregar et al., 2012). Μικροοργανισμοί που εμφανίζονται ως έγκλειστα μέσα στα ερυθρά αιμοσφαίρια είναι είδη των γενών *Babesia, Theilleria, Mycoplasma* και *Anaplasma* (Gladden et al., 2015; Henniger et al., 2013; Izzo et al., 2010).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Η αναγεννητική αναιμία συνδέεται με την παρουσία εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων όπως επίσης και ορισμένα νοσήματα του σπλήνα, του μυελού των οστών και η τοξίκωση από μόλυβδο (Barger, 2010).

1.2.4.2. Λευκά αιμοσφαίρια

Η τοξίκωση του οργανισμού κυρίως από gram (-) βακτήρια και η σηψαιμία οδηγούν σε διαταραχή στην παραγωγή και ωρίμανση των ουδετερόφιλων στον μυελό των οστών . Ανάλογα με τη σοβαρότητα της τοξίκωσης μπορεί τα λευκά αιμοσφαίρια να εμφανίσουν κυτταροπλασματική βασιφιλία, σωμάτια Dohle στο κυτταρόπλασμα, θολό κυτταρόπλασμα ή τοξικά κοκκία ή να εμφανιστούν γιγάντια μη εκφυλισμένα ουδετερόφιλα (Jones and Allison, 2007; Weiss, 1984).

Σε περιπτώσεις φλεγμονής αναφέρονται σποραδικά περιστατικά μηρυκαστικών, με τη μορφολογική ανωμαλία Pseudo Pelger – Huët. Πρόκειται για δυσλειτουργία στην κοκκιοκυτταροποίηση κατά την οποία οι λοβοί των πυρήνων δεν σχηματίζονται σωστά. Στα μηρυκαστικά έχει αναφερθεί επίκτητη διαταραχή που προκαλείται από φλεγμονώδη νοσήματα, όπως μαστίτιδα, μητρίτιδα και τραυματική κεκρυφαλοπεριτονίτιδα (Jones and Allison, 2007).

Σε βοοειδή των φυλών Herford, Japanese Black και Brangus έχει διαπιστωθεί η παρουσία μεγάλων ανώμαλων κοκκίων στα ουδετερόφιλα, τα εωσινόφιλα και τα βασίφιλα καθώς και ανωμαλίες στα αιμοπετάλια λόγω του συνδρόμου Chediak- Higashi (Jones and Allison, 2007).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Στο κυτταρόπλασμα των λευκών αιμοσφαιρίων διαπιστώνονται έγκλειστα μικροοργανισμών όπως το *Anaplasma phagocytophilum* στα ουδετερόφιλα, εωσινόφιλα και μονοκύτταρα προβάτων, μετά από πειραματική μόλυνσή τους (Woldehiwet, 1987). Έγκλειστα του *A. phagocytophilum* διαπιστώθηκαν και στα ουδετερόφιλα και τα λεμφοκύτταρα ενός νεογέννητου μόσχου που μολύνθηκε με κάθετη μετάδοση από την μολυσμένη μητέρα (Henniger et al., 2013). Ακόμη η *Theileria ovis* ανευρίσκεται στα λεμφοκύτταρα του περιφερειακού αίματος των προβάτων (Hussein et al., 2017).

1.2.4.3. Αιμοπετάλια

Η επίδραση παραγόντων στα αιμοπετάλια αφορά κυρίως το προαναλυτικό στάδιο και τους χειρισμούς του δείγματος και αναφέρθηκαν στο αντίστοιχο κεφάλαιο.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

2. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abutarbush, S.M., 2015. Hematological and serum biochemical findings in clinical cases of cattle naturally infected with lumpy skin disease. Journal of infection in developing countries 9, 283-288.

Adili, n., Melizi, M., 2013. The effect of age, sex and altitude on the morphometry of red blood cells in small ruminants. J. Anim. Sci. Adv. 3, 27-32.

Adili, N., Melizi, M., Bennoune, O., 2013. The influence of age, sex and altitude on the morphometry of red blood cells in bovines. Veterinary world 6, 476-478.

Ahmadi-hamedani, M., Khaki, Z., Rahbari, S., A., A.-h.M., 2012. Hematological profiles of goats naturally infected with Anaplasma ovis in north and northeast Iran. Comp Clin Pathol 21, 1179-1182.

Al-Habsi, K., Johnson, E.H., Kadim, I.T., Srikandakumar, A., Annamalai, K., Al-Busaidy, R., Mahgoub, O., 2007. Effects of low concentrations of dietary cobalt on liveweight gains, haematology, serum vitamin B(12) and biochemistry of Omani goats. Vet J 173, 131-137.

Alam, M., Hasanuzzaman, M., Hassan, M.M., Rakib, T.M., Hossain, M.E., Rashid, M.H., Sayeed, M.A., Philips, L.B., Hoque, M.A., 2018. Assessment of transport stress on cattle travelling a long distance (approximately 648 km), from Jessore (Indian border) to Chittagong, Bangladesh. Veterinary record open 5, e000248.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Alani, A.J., Herbert, I.V., 1988. Pathogenesis of infection with Theileria recondita (Wales) isolated from Haemaphysalis punctata from north Wales. Vet Parasitol 28, 293-301.

Allen, J.G., Masters, H.G., Peet, R.L., Mullins, K.R., Lewis, R.D., Skirrow, S.Z., Fry, J., 1983. Zinc toxicity in ruminants. J Comp Pathol 93, 363-377.

Anderson, B.H., Watson, D.L., Colditz, I.G., 1999. The effect of dexamethasone on some immunological parameters in cattle. Vet Res Commun 23, 399-413.

Anosa, V.O., Logan-Henfrey, L.L., Shaw, M.K., 1992. A light and electron microscopic study of changes in blood and bone marrow in acute hemorrhagic Trypanosoma vivax infection in calves. Veterinary pathology 29, 33-45.

Ashuma, Sharma, A., Singla, L.D., Kaur, P., Bal, M.S., Batth, B.K., Juyal, P.D., 2013. Prevalence and haemato-biochemical profile of Anaplasma marginale infection in dairy animals of Punjab (India). Asian Pacific journal of tropical medicine 6, 139-144.

Aslani, M.R., Mohri, M., Movassaghi, A.R., 2005. Heinz body anaemia associated with onion (Allium cepa)

toxicosis in a flock of sheep. Comp Clin Pathol 14, 118-120.

Athanasiou, L.V., 2014. Quality policy in the veterinary diagnostic laboratory; the paradigm of application of Good Laboratory Practice. J Hellenic Vet Med Soc 65, 139-148.

Athanasiou, L.V., Giannakopoulos, C.G., Polizopoulou, Z.S., Katsogiannou, E.G., Kontos, V., 2013. A comparative study of the ovine haemogram:

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

CELL-DYN 3500 versus manual methods. American Journal of Animal and Veterinary Sciences 8, 203-209.

Athanasiou, L.V., Tsokana, C.N., Pardali, D., Moraitou, K.A., 2018. Histograms of Complete Blood Counts in Dogs: Maximizing Diagnostic Information. Topics in companion animal medicine 33, 141-146.

Bal, M.S., Mahajan, V., Filia, G., Kaur, P., Singh, A., 2016. Diagnosis and management of bovine babesiosis outbreaks in cattle in Punjab state. Veterinary world 9, 1370-1374.

Baldissera, M.D., Pivoto, F.L., Bottari, N.B., Tonin, A.A., Machado, G., Aires, A.R., Rocha, J.F., Pelinson, L.P., Dalenogare, D.P., Schetinger, M.R., Morsch, V.M., Leal, M.L., Da Silva, A.S., 2015. Effect of zinc supplementation on ecto-adenosine deaminase activity in lambs infected by Haemonchus contortus: highlights on acute phase of disease. Experimental parasitology 151-152, 34-38.

Barger, A.M., 2010. Erythrocyte morphology, In: Schalm's veterinary hematology, 6th ed. John Wiley & Sons, Ames, Iowa, USA, pp. 144-151.

Bezerra, L.R., Oliveira, W.D.C., Silva, T.P.D., Torreão, J.N.C., Marques, C.A.T., AraújO, M.J., Oliveira, R.L., 2017. Comparative hematological analysis of Morada Nova and Santa Inês ewes in all reproductive stages. Pesq. Vet. Bras. 37, 408-414.

Biryomumaisho, S., Rwakishaya, E.K., Melville, S.E., Cailleau, A., Lubega, G.W., 2013. Livestock trypanosomosis in Uganda: parasite heterogeneity and anaemia status of naturally infected cattle, goats and pigs. Parasitology research 112, 1443-1450.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Bordoloi, G., Jas, R., Ghosh, J.D., 2012. Changes in the haemato-biochemical pattern due to experimentally induced haemonchosis in Sahabadi sheep. Journal of parasitic diseases : official organ of the Indian Society for Parasitology 36, 101-105.

Braun, J.P., Bourges-Abella, N., Geffre, A., Concordet, D., Trumel, C., 2015. The preanalytic phase in veterinary clinical pathology. Vet Clin Pathol 44, 8-25.

Braun, U., Nuss, K., Wehbrink, D., Rauch, S., Pospischil, A., 2008. Clinical and ultrasonographic findings, diagnosis and treatment of pyelonephritis in 17 cows. Vet J 175, 240-248.

Braun, U., Reif, C., Nuss, K., Hilbe, M., Gerspach, C., 2019. Clinical, laboratory and ultrasonographic findings in 87 cows with type-4 abomasal ulcer. BMC Vet Res 15, 100.

Braun, U., Schmid, T., Muggli, E., Steininger, K., Previtali, M., Gerspach, C., Pospischil, A., Nuss, K., 2010. Clinical findings and treatment in 63 cows with haemorrhagic bowel syndrome. Schweiz Arch Tierheilkd 152, 515-522.

Breeze, R.G., Pirie, H.M., Selman, I.E., Wiseman, A., 1976. Pulmonary arterial thrombo-embolism and pulmonary arterial mycotic aneurysms in cattle with vena caval thrombosis: a condition resembling the Hughes-Stovin syndrome. The Journal of pathology 119, 229-237.

Bundza, A., Sugden, E.A., Nielsen, K., Hartin, K.E., 1982. Copper toxicosis in lambs fed milk replacer. The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne 23, 102-105.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Byers, S.R., Kramer, J.W., 2010. Normal Hematology of Sheep and Goats, In: Schalm's Veterinary Hematology, 6th ed. Blackwell Publishing, Ames, IA, USA, pp. 836-842.

Camus, M.S., 2016. Quality control for the in-clinic veterinary laboratory and pre-analytic considerations for specialized diagnostic testing. Vet J 215, 3-9.

Canning, P., Hassfurther, R., TerHune, T., Rogers, K., Abbott, S., Kolb, D., 2017. Efficacy and clinical safety of pegbovigrastim for preventing naturally occurring clinical mastitis in periparturient primiparous and multiparous cows on US commercial dairies. J Dairy Sci 100, 6504-6515.

Castillo, J.M., Dockweiler, J.C., Cheong, S.H., Diel de Amorim, M., 2018. Pyometra and unilateral uterine horn torsion in a sheep. Reprod Domest Anim 53, 274-277.

Cebra, C., Cebra, M., 1998. hematopoietic and hemolymphatic disorders, In: Large animal internal medicine. Williams & Wilkins, London, pp. 321-346.

Cebra, C., Cebra, M., 2002. Diseases of the Hematologic, Immunologic, and Lymphatic Systems (Multisystem Diseases), In: Sheep and goat medicine, first ed. Elsevier, Pennsylvania, pp. 359-391.

Chae, J.B., Park, J., Jung, S.H., Kang, J.H., Chae, J.S., Choi, K.S., 2019. Acute phase response in bovine coronavirus positive post-weaned calves with diarrhea. Acta Vet Scand 61, 36.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Chi, Z., Liu, R., Yang, B., Zhang, H., 2010. Toxic interaction mechanism between oxytetracycline and bovine hemoglobin. Journal of hazardous materials 180, 741-747.

Christodoulopoulos, G., Roubies, N., 2007. Diagnosis and treatment of copper poisoning caused by accidental feeding on poultry litter in a sheep flock. Aust Vet J 85, 451-453.

Cihan, H., Temizel, E.M., Yilmaz, Z., Ozarda, Y., 2016. Serum iron status and its relation with haematological indexes before and after parturition in sheep. Kafkas Univ Vet Fak Derg 22, 679-683.

Clark, I.A., Dimmock, C.K., 1971. The toxicity of Cheilanthes sieberi to cattle and sheep. Aust Vet J 47, 149-152.

Corapi, W.V., Elliott, R.D., French, T.W., Arthur, D.G., Bezek, D.M., Dubovi, E.J., 1990. Thrombocytopenia and hemorrhages in veal calves infected with bovine viral diarrhea virus. Journal of the American Veterinary Medical Association 196, 590-596.

Cregar, L.C., Wiedmeyer, C.E., Ringen, D.R., Evans, T.J., Johnson, G.C., Kuroki, K., 2012. Copper toxicosis in a Boer goat. Vet Clin Pathol 41, 502-508.

Dabak, M., Karapinar, T., Gulacti, I., Bulut, H., Kizil, O., Aydin, S., 2007. Hemorrhagic syndrome-like disease in calves with bovine viral diarrhea and mucosal disease complex. J Vet Intern Med 21, 514-518.

Del Piero, F., Poppenga, R.H., 2006. Chlorophacinone exposure causing an epizootic of acute fatal hemorrhage in lambs. J Vet Diagn Invest 18, 483-485.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Deutskens, F., Lamp, B., Riedel, C.M., Wentz, E., Lochnit, G., Doll, K., Thiel, H.J., Rumenapf, T., 2011. Vaccine-induced antibodies linked to bovine neonatal pancytopenia (BNP) recognize cattle major histocompatibility complex class I (MHC I). Veterinary research 42, 97.

Divers, T.J., Peek, S.F., 2018. Therapeutics and Routine Procedures, In: Rebhun's Diseases of

Dairy Cattle, third ed. Elsevier,, Missouri, pp. 17- 44.

Dorny, P., Stoliaroff, V., Charlier, J., Meas, S., Sorn, S., Chea, B., Holl, D., Van Aken, D., Vercruysse, J., 2011. Infections with gastrointestinal nematodes, Fasciola and Paramphistomum in cattle in Cambodia and their association with morbidity parameters. Vet Parasitol 175, 293-299.

Draksler, D., Nunez, M., Apella, M.C., Aguero, G., Gonzalez, S., 2002. Copper deficiency in Creole goat kids. Reproduction, nutrition, development 42, 243-249.

Egli, C.P., Blum, J.W., 1998. Clinical, haematological, metabolic and endocrine traits during the first three months of life of suckling simmentaler calves held in a cow-calf operation. Zentralbl Veterinarmed A 45, 99-118.

Esmaeilnejad, B., Tavassoli, M., Asri-Rezaei, S., 2012. Investigation of hematological and biochemical parameters in small ruminants naturally infected with Babesia ovis. Veterinary research forum : an international quarterly journal 3, 31-36.

Favero, F.C., Buzzulini, C., Cruz, B.C., Felippelli, G., Maciel, W.G., Salatta, B., Siniscalchi, D., Lopes, W.D.Z., Teixeira, W.F.P., Soares, V.E., de Oliveira, G.P., da Costa, A.J., 2016. Experimental infection of calves

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

with Haemonchus placei or Haemonchus contortus: Assessment of clinical, hematological and biochemical parameters and histopathological characteristics of abomasums. Experimental parasitology 170, 125-134.

Fouzy, A.S., Desouky, H.M., Ghazi, Y.A., Hammam, A.M., 2007. Some clinico and histopathological changes in female goats experimentally exposed to dioxin. Pakistan journal of biological sciences : PJBS 10, 1213-1220.

Friend, S.C., Hancock, D.S., Schiefer, H.B., Babiuk, L.A., 1983. Experimental T-2 toxicosis in sheep. Canadian journal of comparative medicine : Revue canadienne de medecine comparee 47, 291-297.

Fukunaka, M., Toyoda, Y., Kobayashi, Y., Furuoka, H., Inokuma, H., 2010. Bone marrow aplasia with pancytopenia and hemorrhage in a Japanese Black calf. The Journal of veterinary medical science 72, 1655-1656.

Genova, S.G., Streeter, R.N., Velguth, K.E., Snider, T.A., Kocan, K.M., Simpson, K.M., 2011. Severe anemia associated with Mycoplasma wenyonii infection in a mature cow. The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne 52, 1018-1021.

George, J.W., 1999. Ocular Field Width and Platelet Estimates [Letter]. Vet Clin Path 28, 126.

George, J.W., Snipes, J., Lane, V.M., 2010. Comparison of bovine hematology reference intervals from 1957 to 2006. Vet Clin Pathol 39, 138-148.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Giannitti, F., Rioseco, M.M., Garcia, J.P., Beingesser, J., Woods, L.W., Puschner, B., Uzal, F.A., 2014. Diagnostic exercise: hemolysis and sudden death in lambs. Veterinary pathology 51, 624-627.

Gladden, N., Haining, H., Henderson, L., Marchesi, F., Graham, L., McDonald, M., Murdoch, F.R., Bruguera Sala, A., Orr, J., Ellis, K., 2015. A case report of Mycoplasma wenyonii associated immune-mediated haemolytic anaemia in a dairy cow. Irish veterinary journal 69, 1.

Gokce, H.I., Woldehiwet, Z., 1999. Differential haematological effects of tick-borne fever in sheep and goats. Zentralbl Veterinarmed B 46, 105-115.

Green, L.E., Graham, M., Morgan, K.L., 1997. Preliminary study of the effect of iron dextran on a non-regenerative anaemia of housed lambs. Vet Rec 140, 219-222.

Gundlach, N.H., Feldmann, M., Gundelach, Y., Gil, M.A., Siebert, U., Hoedemaker, M., Schmicke, M., 2017. Dehydroepiandrosterone and cortisol/dehydroepiandrosterone ratios in dairy cattle with postpartum metritis. Res Vet Sci 115, 530-533.

Gupta, A., Stockham, S.L., 2014. Refractometric total protein concentrations in icteric serum from dogs. Journal of the American Veterinary Medical Association 244, 63-67.

Harvey, J.W., 2001. Examination of Blood Samples, In: Atlasof veterinary hematology: bloodand bonemarrowof domestic animals. Elsevier, Philadelphia,, USA, pp. 3- 20.

Harvey, J.W., 2012a. Evaluation of erythrocytes, In: Veterinary Hematology - Diagnostic Guide and Color Atlas. Elsevier, St Louis, Missouri, pp. 49-121.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Harvey, J.W., 2012b. Evaluation of leukocytic disorders, In: Veterinary Hematology - Diagnostic Guide and Color Atlas. Elsevier, St Louis, Missouri, pp. 122-176.

Heidarpour, M., Fakhrieh, M., Aslani, M.R., Mohri, M., Keywanloo, M., 2013. Oxidative effects of long-term onion (Allium cepa) feeding on goat erythrocytes. Comp Clin Pathol 22, 195-202.

Hemalatha, S., Roy, P., Purushothaman, V., Iyue, M., 2013. Paratuberculosis in different breeds of sheep: A retrospective study of cases. International journal of mycobacteriology 2, 166-170.

Henniger, T., Henniger, P., Grossmann, T., Distl, O., Ganter, M., von Loewenich, F.D., 2013. Congenital infection with Anaplasma phagocytophilum in a calf in northern Germany. Acta Vet Scand 55, 38.

Hussein, N.M., Mohammed, E.S., Hassan, A.A., El-Dakhly, K.M., 2017. Distribution pattern of Babesia and Theileria species in sheep in Qena Province, Upper Egypt. Arch Parasitol 1, 1- 4.

Inaba, M., Yawata, A., Koshino, I., Sato, K., Takeuchi, M., Takakuwa, Y., Manno, S., Yawata, Y., Kanzaki, A., Sakai, J., Ban, A., Ono, K., Maede, Y., 1996. Defective anion transport and marked spherocytosis with membrane instability caused by hereditary total deficiency of red cell band 3 in cattle due to a nonsense mutation. J Clin Invest 97, 1804-1817.

Irmak, K., Sen, I., Col, R., Birdane, F.M., Guzelbektes, H., Civelek, T., Yilmaz, A., Turgut, K., 2006. The evaluation of coagulation profiles in calves with suspected septic shock. Vet Res Commun 30, 497-503.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Izzo, M.M., Poe, I., Horadagoda, N., De Vos, A.J., House, J.K., 2010. Haemolytic anaemia in cattle in NSW associated with Theileria infections. Aust Vet J 88, 45-51.

Jardim, J.C., Amaral, B.P., Martins, M., Sebastian, P., Heinemann, M.B., Cortez, A., Weiblen, R., Flores, E.F., 2018. Respiratory signs, fever and lymphopenia in calves inoculated with Brazilian HoBi-like pestiviruses. Microbial pathogenesis 123, 264-268.

Jeffers, M., Lenghaus, C., 1986. Granulocytopaenia and thrombocytopaenia in dairy cattle--a suspected mycotoxicosis. Aust Vet J 63, 262-264.

Jezek, J., Nemec, M., Staric, J., M., K., 2011. Age related changes and reference intervals of haematological variables in dairy calves. Bull Vet Inst Pulawy 55, 471-478.

Jones, M.L., Allison, R.W., 2007. Evaluation of the ruminant complete blood cell count. Vet Clin North Am Food Anim Pract 23, 377-402, v.

Jubb, T.F., Jerrett, I.V., Browning, J.W., Thomas, K.W., 1990. Haemoglobinuria and hypophosphataemia in postparturient dairy cows without dietary deficiency of phosphorus. Aust Vet J 67, 86-89.

Katsogiannou E.G, Athanasiou L.V., Christodoulopoulos G., Polizopoulou Z.S., 2018. Diagnostic approach of anemia in ruminants. J Hell Vet Med Soc 69, 1033-1046

Katsoulos, P.D., Chaintoutis, S.C., Dovas, C.I., Polizopoulou, Z.S., Brellou, G.D., Agianniotaki, E.I., Tasioudi, K.E., Chondrokouki, E., Papadopoulos, O., Karatzias, H., Boscos, C., 2018. Investigation on the incidence of adverse reactions, viraemia and haematological

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

changes following field immunization of cattle using a live attenuated vaccine against lumpy skin disease. Transbound Emerg Dis 65, 174-185.

Katsoulos, P.D., Christodoulopoulos, G., Karatzia, M.A., Pourliotis, K., Minas, A., 2011. Liver flukes promote cholelithiasis in sheep. Vet Parasitol 179, 262-265.

Katunguka-Rwakishaya, E., Murray, M., Holmes, P.H., 1997. Pathophysiology of Trypanosoma congolense infection in two breeds of sheep, Scottish blackface and Finn Dorset. Vet Parasitol 68, 215-225.

Keshavarzi, B., Seradj, A., Akbari, Z., Moore, F., Shahraki, A.R., Pourjafar, M., 2015. Chronic arsenic toxicity in sheep of Kurdistan province, western Iran. Archives of environmental contamination and toxicology 69, 44-53.

Klinkon, M., Ježek, J., 2012. Values of Blood Variables in Calves, In: A Bird's-Eye View of Veterinary Medicine. InTech, Croatia, pp. 301- 320.

Knight, R.A., 1980. Response of lambs to challenge infections after repeated inoculations with Fasciola hepatica cysts. Proc. Helminthol. Soc. Wash. 47, 186-191.

Kremer, W.D., Noordhuizen-Stassen, E.N., Grommers, F.J., Daemen, A.J., Brand, A., Burvenich, C., 1993. Blood polymorphonuclear leukocyte chemotaxis during experimental Escherichia coli bovine mastitis. J Dairy Sci 76, 2613-2618.

Lee, S.H., Kim, S., Park, S.C., Kim, M.J., 2002. Cytotoxic activities of Leptospira interrogans hemolysin SphH as a pore-forming protein on mammalian cells. Infection and immunity 70, 315-322.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Liang, S., Bao, C., Zhou, M., Hu, J., Tang, F., Guo, X., Jiao, Y., Zhang, W., Luo, P., Li, L., Zhu, K., Tan, W., Lu, Q., Ge, H., Chen, A., 2014. Seroprevalence and risk factors for severe fever with thrombocytopenia syndrome virus infection in Jiangsu Province, China, 2011. The American journal of tropical medicine and hygiene 90, 256-259.

Lotfollahzadeh, S., Mohri, M., Bahadori Sh, R., Dezfouly, M.R., Tajik, P., 2008. The relationship between normocytic, hypochromic anaemia and iron concentration together with hepatic enzyme activities in cattle infected with Fasciola hepatica. Journal of helminthology 82, 85-88.

Martinez-Moreno, A., Jimenez, V., Martinez-Cruz, M.S., Martinez-Moreno, F.J., Becerra, C., Hernandez, S., 1997. Triclabendazole treatment in experimental goat fasciolosis: anthelmintic efficacy and influence in antibody response and pathophysiology of the disease. Vet Parasitol 68, 57-67.

Masseau, I., Fecteau, G., Desrochers, A., Francoz, D., Lanthier, I., Vaillancourt, D., 2004. Hemoperitoneum caused by the rupture of a granulosa cell tumor in a Holstein heifer. The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne 45, 504-506.

Matsuda, K., Nomoto, H., Kawamura, Y., Someya, Y., Koiwa, M., Taniyama, H., 2010. Hemophagocytic histiocytic sarcoma in a Japanese black cow. Veterinary pathology 47, 339-342.

McKenzie, R.A., 1978. Bovine enzootic haematuria in Queensland. Aust Vet J 54, 61-64.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Medaille, C., Briend-Marchal, A., 2008. La qualite: du prelevement au resultat, In: Guide pratique des analyses biologiques veterinaires, Paris, pp. 35-36.

Mirzadeh, K., Tabatabaei, S., Bojarpour, M., Mamoei, M., 2010. Comparative study of hematological parameters according strain, age, sex, physiological status and season in Iranian cattle. J Anim Vet Adv 9, 2123-2127.

Moll, G., Lohding, A., Young, A.S., Leitch, B.L., 1986. Epidemiology of theileriosis in calves in an endemic area of Kenya. Vet Parasitol 19, 255-273.

Morgan, K.T., Coop, R.L., Doxey, D.L., 1975. Amprolium poisoning of preruminant lambs: an investigation of the encephalopathy and the haemorrhagic and diarrhoeic syndromes. The Journal of pathology 116, 73-81.

Morris, J.G., Cripe, W.S., Chapman, H.L., Jr., Walker, D.F., Armstrong, J.B., Alexander, J.D., Jr., Miranda, R., Sanchez, A., Jr., Sanchez, B., Blair-West, J.R., et al., 1984. Selenium deficiency in cattle associated with Heinz bodies and anemia. Science 223, 491-493.

Nagahata, H., 2004. Bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD): a review. The Journal of veterinary medical science 66, 1475-1482.

Nassiri, S.M., Darvishi, S., Khazraiinia, P., 2011. Bovine immune-mediated hemolytic anemia: 13 cases (November 2008-August 2009). Vet Clin Pathol 40, 459-466.

Niu, G., Li, J., Liang, M., Jiang, X., Jiang, M., Yin, H., Wang, Z., Li, C., Zhang, Q., Jin, C., Wang, X., Ding, S., Xing, Z., Wang, S., Bi, Z., Li, D., 2013.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus among domesticated animals, China. Emerg Infect Dis 19, 756-763.

Oikonomidis, I.L., Brozos, C., Kiossis, E., Kritsepi-Konstantinou, M., 2018. Combined and breed-specific RIs for hematologic, biochemical, and hormonal analytes in Chios and Florina adult rams. Vet Clin Pathol 47, 56-68.

Ok, M., Sen, I., Turgut, K., Irmak, K., 2001. Plasma gastrin activity and the diagnosis of bleeding abomasal ulcers in cattle. Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine 48, 563-568.

Omer, O.H., El-Malik, K.H., Mahmoud, O.M., Haroun, E.M., Hawas, A., Sweeney, D., Magzoub, M., 2002. Haematological profiles in pure bred cattle naturally infected with Theileria annulata in Saudi Arabia. Vet Parasitol 107, 161-168.

Pandey, G.S., Simulundu, E., Mwiinga, D., Samui, K.L., Mweene, A.S., Kajihara, M., Mangani, A., Mwenda, R., Ndebe, J., Konnai, S., Takada, A., 2017. Clinical and subclinical bovine leukemia virus infection in a dairy cattle herd in Zambia. Arch Virol 162, 1051-1056.

Paxton, E.A., Scott, G.R., 1989. Detection of antibodies to the agent of tick-borne fever by indirect immunofluorescence. Vet Microbiol 21, 133-138.

Peek, S.F., McGuirk, S.M., Sweeney, R.W., Cummings, K.J., 2018. Infectious diseases of the gastrointestinal tract, In: Rebhun’s diseases of dairy cattle, 3rd ed. Elsevier, China, pp. 249- 356.

Pohlman, L.M., 2010. Basophils, Mast Cells, and Their Disorders, In: Schalm's Veterinary Hematology, sixth ed. Blackwell, Ames, IOva, USA, pp. 290- 297.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Polizopoulou, Z.S. 1991. Υποκλινική τοξικωση απο μόλυβδο στο πρόβατο. Επιδημιολογική και πειραματική μελέτη, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

Prakash, A.S., Pereira, T.N., Smith, B.L., Shaw, G., Seawright, A.A., 1996. Mechanism of bracken fern carcinogenesis: evidence for H-ras activation via initial adenine alkylation by ptaquiloside. Natural toxins 4, 221-227.

Radin, M.J., 2012. Laboratory Evaluation of Lipids, In: Veterinary Hematology and Clinical Chemistry, second ed. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA, pp. 480- 496.

Radostits, O., M., , Gay, C., C.,, Hinchcliff, K., W.,, Constable, P., D. , 2006. Diseases of the hemolymphatic and immune systems, In: Veterinary medicine, A textbook of the diseases of cattle, sheep, goats, pigs and horses, 10th ed. Elsevier, London, pp. 439- 469.

Rae, H.A., 1999. Onion toxicosis in a herd of beef cows. The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne 40, 55-57.

Rana, T., Bera, A.K., Das, S., Bhattacharya, D., Bandyopadhyay, S., Pan, D., Kumar Das, S., 2010. Effect of chronic intake of arsenic-contaminated water on blood oxidative stress indices in cattle in an arsenic-affected zone. Ecotoxicology and environmental safety 73, 1327-1332.

Randhawa, S.S., Sharma, D.K., Randhawa, C.S., Gill, B.S., Brar, R.S., Singh, J., 1995. An outbreak of bacillary haemoglobinuria in sheep in India. Trop Anim Health Prod 27, 31-36.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Randolph, J.F., Peterson, M.E., Stokol, T., 2010. Erythrocytosis and Polycythemia, In: Schalm's Veterinary Hematology, sixth ed. Blackwell, Iova, USA, pp. 162-166.

Rebhun, W.C., French, T.W., Perdrizet, J.A., Dubovi, E.J., Dill, S.G., Karcher, L.F., 1989. Thrombocytopenia associated with acute bovine virus diarrhea infection in cattle. J Vet Intern Med 3, 42-46.

Roland, L., Drillich, M., Iwersen, M., 2014. Hematology as a diagnostic tool in bovine medicine. J Vet Diagn Invest 26, 592-598.

Ross, J.G., Todd, J.R., Dow, C., 1966. Single experimental infections of calves with the liver fluke, Fasciola Hepatica (Linnaeus 1758). J Comp Pathol 76, 67-81.

Saleh, M.A., 2008. Circulating oxidative stress status in desert sheep naturally infected with Fasciola hepatica. Vet Parasitol 154, 262-269.

Salvesen, O., Reiten, M.R., Heegaard, P.M., Tranulis, M.A., Espenes, A., Skovgaard, K., Ersdal, C., 2016. Activation of innate immune genes in caprine blood leukocytes after systemic endotoxin challenge. BMC Vet Res 12, 241.

Schlerka, G., Tataruch, F., Hogler, S., Url, A., Krametter, R., Kossler, D., Schmidt, P., 2004. [Acute lead poisoning in cows due to feeding of lead contaminated ash residue]. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 117, 52-56.

Schreuder, B.E., 1993. Thrombocytopenia in lambs fed with bovine colostrum. The veterinary quarterly 15, 37-39.

Shemanchuk, J.A., Haufe, W.O., Thompson, C.O., 1960. Anemia in Range Cattle Heavily Infested with the Short-Nosed Sucking Louse,

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Haematopinus Eurysternus (NITZ.) (Anoplura: Haematopinidae). Canadian journal of comparative medicine and veterinary science 24, 158-161.

Singh, J., Gupta, S.K., Singh, R., Hussain, S.A., 2014. Etiology and haemato-biochemical alterations in cattle of Jammu suffering from anaemia. Veterinary World, 7, 49-51.

Singh, K.S., Mukhopadhayay, S.K., Ganguly, S., Niyogi, D., Thiyagaseelan, C., Ali, I., 2011. Hematological and biochemical studies of stephanofilarial dermatitis in naturally infected cattle of West Bengal, India. Res Vet Sci 91, 194-195.

Stiene-Martin, E.A., 1980. Causes for poor leukocyte distribution in manual spreader-slide blood films. Am J Med Technol 46, 624-632.

Stock, M.L., Smith, B.I., Engiles, J.B., 2011. Disseminated hemangiosarcoma in a cow. The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne 52, 409-413.

Stockham, S.L., Kjemtrup, A.M., Conrad, P.A., Schmidt, D.A., Scott, M.A., Robinson, T.W., Tyler, J.W., Johnson, G.C., Carson, C.A., Cuddihee, P., 2000. Theileriosis in a Missouri beef herd caused by Theileria buffeli: case report, herd investigation, ultrastructure, phylogenetic analysis, and experimental transmission. Veterinary pathology 37, 11-21.

Stockham, S.L., Scott, M.A., 2008. Introductory Concept, In: Fundamentas of Veterinary Clinical Pathology, Second ed. Blackwell, Iova, USA, pp. 4-52.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Stogdale, L., 1978. Chronic copper poisoning in dairy cows. Aust Vet J 54, 139-141.

Stokol, T., Erb, H.N., 2007. A comparison of platelet parameters in EDTA- and citrate-anticoagulated blood in dogs. Vet Clin Pathol 36, 148-154.

Stromberg, P.C., Guillot, F.S., 1987. Hematology in the regressive phase of bovine psoroptic scabies. Veterinary pathology 24, 371-377.

Stuen, S., Artursson, K., 2000. Effects of the dose of Ehrlichia phagocytophila on the severity of experimental infections in lambs. Vet Rec 146, 669-672.

Stuen, S., Braten, M., Bergstrom, K., Bardsen, K., 2008. Cyclic variation in lambs infected with Anaplasma phagocytophilum. Vet Rec 163, 338-340.

Stuen, S., Engvall, E.O., Artursson, K., 1998. Persistence of Ehrlichia phagocytophila infection in lambs in relation to clinical parameters and antibody responses. Vet Rec 143, 553-555.

Stuen, S., Grova, L., Granquist, E.G., Sandstedt, K., Olesen, I., Steinshamn, H., 2011. A comparative study of clinical manifestations, haematological and serological responses after experimental infection with Anaplasma phagocytophilum in two Norwegian sheep breeds. Acta Vet Scand 53, 8.

Stuen, S., Torsteinbo, W.O., Bergstrom, K., Bardsen, K., 2009. Superinfection occurs in Anaplasma phagocytophilum infected sheep irrespective of infection phase and protection status. Acta Vet Scand 51, 41.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Suttle, N.F., Jones, D.G., Woolliams, C., Woolliams, J.A., 1987. Heinz body anaemia in lambs with deficiencies of copper or selenium. The British journal of nutrition 58, 539-548.

Suzuki, J., Sasaoka, F., Fujihara, M., Watanabe, Y., Tasaki, T., Oda, S., Kobayashi, S., Sato, R., Nagai, K., Harasawa, R., 2011. Molecular identification of `Candidatus Mycoplasma haemovis' in sheep with hemolytic anemia. The Journal of veterinary medical science 73, 1113-1115.

Takagi, M., Takagaki, K., Kamimura, S., Zizhohara, K., Miyoshi, A., Yasuda, Y., Kawasaki, Y., Endo, Y., Ohishi, A., Yasumura, E., Deguchi, E., 2006. Primary erythrocytosis in a Japanese black calf: a case report. Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine 53, 296-299.

Takagi, M., Yamato, O., Sasaki, Y., Mukai, S., Fushimi, Y., Yoshida, T., Mizukami, K., Shoubudani, T., Amimoto, K., Chuma, T., Shahada, F., Endo, Y., Deguchi, E., 2009. Successful treatment of bacillary hemoglobinuria in Japanese Black cows. The Journal of veterinary medical science 71, 1105-1108.

Tartour, G., Obeid, H.M., Adam, S.E., Idris, O.F., 1973. Haematological changes in sheep and calves following prolonged oral administration of Ipomoea carnea. Trop Anim Health Prod 5, 284-292.

Tennant, B., Harrold, D., Reina-Guerra, M., Laben, R.C., 1969. Arterial pH, PO2 and PCO2 of calves with familial bovine polycythemia. Cornell Vet 59, 594-604.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Thrall, M.A., 2012a. Classification of and Diagnostic Approach to Anemia, In: Veterinary Hematology and Clinical Chemistry, second ed. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA, pp. 75-80.

Thrall, M.A., 2012b. Erythrocyte morphology, In: Veterinary hematology and clinical chemistry, 2nd ed. HJohn Willey & Sons, Inc, Ames, Iowa, USA, pp. 61- 74.

Trachsel, D., Tschudi, P., Egli, K., Bonnemain, P., Meylan, M., 2010. [Severe cardiac malformation with secondary polycythemia in a 5-month old calf]. Schweiz Arch Tierheilkd 152, 483-488.

Trueman, K.F., Blight, G.W., 1978. The effect of age on resistance of cattle to Babesia bovis. Aust Vet J 54, 301-305.

Ulvund, M.J., 1990. Ovine white-liver disease (OWLD). Changes in blood chemistry. Acta Vet Scand 31, 277-286.

Van Aken, D., Vercruysse, J., Dargantes, A.P., Lagapa, J.T., Raes, S., Shaw, D.J., 1997. Pathophysiological aspects of Mecistocirrus digitatus (Nematoda: Trichostrongylidae) infection in calves. Vet Parasitol 69, 255-263.

Van Dyke, D., Nohr, M.L., Tennant, B., 1968. Erythropoietin and the development of erythrocytes. Erythropoietin enhancing factor in serum of a calf with primary familial polycythaemia. Nature 217, 1027-1028.

Vasileiou, N.G.C., Fthenakis, G.C., Amiridis, G.S., Athanasiou, L.V., Birtsas, P., Chatzopoulos, D.C., Chouzouris, T.M., Giannakopoulos, A., Ioannidi, K.S., Kalonaki, S.N., Katsafadou, A.I., Kyriakis, C.S., Mavrogianni, V.S., Papadopoulos, E., Spyrou, V., Valiakos, G.,

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Venianaki, A.P., Billini, C., 2016. Experiences from the 2014 outbreak of bluetongue in Greece. Small Ruminant Res 142, 61-68.

Vatn, S., Ulvund, M.J., 2000. Abomasal bloat, haemorrhage and ulcers in young Norwegian lambs. Vet Rec 146, 35-39.

Vatta, A.F., Krecek, R.C., Letty, B.A., van der Linde, M.J., Grimbeek, R.J., de Villiers, J.F., Motswatswe, P.W., Molebiemang, G.S., Boshoff, H.M., Hansen, J.W., 2002. Incidence of Haemonchus spp. and effect on haematocrit and eye colour in goats farmed under resource-poor conditions in South Africa. Vet Parasitol 103, 119-131.

Warren, A.L., Stokol, T., Hecker, K.G., Nydam, D.V., 2012. Storage-associated changes in the bovine hemogram with the ADVIA 120 hematology analyzer. Comp Clin Pathol 22, 1235-1240.

Weiser, G., 2005. Veterinary hematology and clinical chemistry, 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc., Armes, Iowa, USA.

Weiss, D.J., 1984. Uniform evaluation and semiquantitative reporting of hematologic data in veterinary laboratories. Vet Clin Pathol 13, 27-31.

Whist, S.K., Storset, A.K., Larsen, H.J., 2002. Functions of neutrophils in sheep experimentally infected with Ehrlichia phagocytophila. Veterinary immunology and immunopathology 86, 183-193.

Winter, A., Clarkson, M., 1992. Anaemia in lambs and kids caused by feeding cow colostrum. In practice 14, 283- 286.

Woldehiwet, Z., 1987. The effects of tick-borne fever on some functions of polymorphonuclear cells of sheep. J Comp Pathol 97, 481-485.

Woldehiwet, Z., 2010. The natural history of Anaplasma phagocytophilum. Vet Parasitol 167, 108-122.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Xu, L.R., 1992. Bracken poisoning and enzootic haematuria in cattle in China. Res Vet Sci 53, 116-121.

Yasini, S., Khaki, Z., Rahbari, S., Kazemi, B., Amoli, J.S., Gharabaghi, A., Jalali, S., 2012. Hematologic and Clinical Aspects of Experimental Ovine Anaplasmosis Caused by Anaplasma ovis in Iran. Iranian journal of parasitology 7, 91-98.

Yeruham, I., Avidar, Y., Harrus, S., Fishman, L., Aroch, I., 2003. Immune-mediated thrombocytopenia and putative haemolytic anaemia associated with a polyvalent botulism vaccination in a cow. Vet Rec 153, 502-504.

Yeruham, I., Hadani, A., Galker, F., Avidar, Y., Bogin, E., 1998. Clinical, clinico-pathological and serological studies of Babesia ovis in experimentally infected sheep. Zentralbl Veterinarmed B 45, 385-394.

Young, K.M., Meadows, R.L., 2010. Eosinophils and Their Disorders, In: Schalm's Veterinary Hematology, sixth ed. Blackwell, Ames, Iova, USA, pp. 281- 290.

Zmigrodzka, M., Winnicka, A., Guzera, M., 2012. Comparison of the influence of EDTA-K3 and sodium citrate on haematology analysis in healthy dogs. Polish journal of veterinary sciences 15, 391-392.

Ιπποκράτης, ο.Κ., 460-377 π.Χ. Άπαντα 4 Περί φύσιος ανθρώπου In: Αρχαία Ελληνική Γραμματεα: Οι Ελληνες. Κάκτος, , p. 154.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

3. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η εκτίμηση της επιρροής προ-αναλυτικών παραγόντων, παραγόντων που επιδρούν κατά την ανάλυση των δειγμάτων και παθολογικών παραγόντων που επηρεάζουν τις αιματολογικές παραμέτρους στα μηρυκαστικά.

Ως προ- αναλυτικοί παράγοντες επιλέχθηκαν η ηλικία, και πιο συγκεκριμένα μόσχοι πριν και μετά τον απογαλακτισμό ηλικίας 2-3 και 15-16 εβδομάδων αντίστοιχα, ενώ παράλληλα διερευνάται η πιθανή συσχέτιση ανάμεσα στις τιμές των διαφόρων αιματολογικών παραμέτρων και της συγκέντρωσης της βιταμίνης Β12.

Όσον αφορά τους παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν τα αποτελέσματα των αιματολογικών εξετάσεων κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, επιλέχθηκε η σύγκριση δύο μεθόδων ανάλυσης του αίματος προβάτων. Συγκεκριμένα, γίνεται σύγκριση των αποτελεσμάτων του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων (WBCs) που εκτιμήθηκε κατά την μικροσκοπική εξέταση και των αποτελεσμάτων από τον αυτόματο αιματολογικό αναλυτή ADVIA 120 και επιβεβαίωση για την χρήση των κατάλληλων συντελεστών διόρθωσης για τον υπολογισμό του αριθμού των WBCs με τη χρήση του μικροσκοπίου. Επιπλέον, γίνεται αξιολόγηση δύο προτεινόμενων συντελεστών διόρθωσης για τον υπολογισμό του αριθμού των αιμοπεταλίων χρησιμοποιώντας τα επιχρίσματα του αίματος.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Τέλος, ως παθολογικός παράγοντας που επηρεάζει τις τιμές των αιματολογικών παραγόντων επιλέχθηκε το *Anaplasma phagocytophilum*, όπου διερευνάται η επίδραση της παρουσίας αντιγόνου κατά την κυτταρολογική εξέταση ή/ και η παρουσία των αντισωμάτων στις τιμές των αιματολογικών παραμέτρων και στη μορφολογία των κυττάρων του αίματος κατά τη μικροσκοπική εξέταση των επιχρισμάτων του αίματος προβάτων.

Σε όλες τις μελέτες, όλες οι διαδικασίες έγιναν σύμφωνα με τα πρότυπα δεοντολογίας της Διακήρυξης του Ελσίνκι του 1975, όπως αναθεωρήθηκε το 2000, καθώς και με τον Εθνική Νομοθεσία και ύστερα από έγκριση της Επιτροπής Δεοντολογίας Χρήσης Ζώων (ΕΔΕΧΖΩ) για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς του Τμήματος Κτηνιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΤΗΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ Β12 ΠΡΙΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑ ΤΟΝ ΑΠΟΓΑΛΑΚΤΙΣΜΟ ΚΑΙ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΤΟΥΣ ΜΕ ΤΙΣ ΤΙΜΕΣ ΤΩΝ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΤΩΝ ΜΟΣΧΩΝ

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Βιταμίνη Β12

1.1.1. Σύνθεση

Η βιταμίνη Β12 ή αλλιώς κοβαλαμίνη, είναι μία από τις οκτώ βιταμίνες του συμπλέγματος Β, σημαντική για τη φυσιολογική λειτουργία του νευρικού συστήματος και την ωρίμανση των ερυθρών αιμοσφαιρίων στο μυελό των οστών. Είναι μία υδατοδιαλυτή βιταμίνη που υπάρχει ως σύμπλεγμα στις ζωικές πρωτεΐνες. Τα μηρυκαστικά λαμβάνουν τη βιταμίνη Β12 με το γάλα, ενώ με την έναρξη της λειτουργίας των προστομάχων, η βιταμίνη Β12 συντίθεται κυρίως από μικροοργανισμούς στη μεγάλη κοιλία, όπως είναι ορισμένα βακτήρια, κυανοβακτήρια και μύκητες. Η σύνθεση της βιταμίνης Β12 γίνεται με δύο τρόπους, έναν αερόβιο ή εξαρτώμενο από το οξυγόνο, από μικροοργανισμούς όπως *Pseudomonas denitrificans* και έναν αναερόβιο ή μη-εξαρτώμενο από το οξυγόνο, από τους μικροοργανισμούς *Bacillus megaterium*, *Propionibacterium shermanii* και *Salmonella typhimurium (Martens et al., 2002)*.

Απαραίτητη για τη σύνθεσή της είναι η συμμετοχή του κοβαλτίου. Επειδή συνήθως, στο άτομο του κοβαλτίου συνδέεται το κυανίδιο, η βιταμίνη Β12 ονομάζεται και κυανοκοβαλαμίνη. Η κυανοκοβαλαμίνη δεν είναι η μοναδική ουσία που συντίθεται, αλλά είναι η πιο ενεργή και πιο σταθερή, ενώ οι άλλες

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

συνήθως δεν έχουν καμία δράση. Για το λόγο αυτό, ο όρος κυανοκοβαλαμίνη χρησιμοποιείται ευρέως στην κλινική πράξη ταυτόσημα με τη βιταμίνη Β12 (McDowell, 2000). Στην αγελάδα για παράδειγμα, έχουν προσδιοριστεί 7 διαφορετικές χημικές ουσίες «ανάλογες» της βιταμίνης Β12, στο δωδεκαδάκτυλο και στον ειλεό (Girard et al., 2009).

1.1.2. Μεταβολισμός

Για την απορρόφηση της βιταμίνης Β12 στα μηρυκαστικά απαιτείται επαρκής ποσότητα κοβαλτίου στην τροφή, καθώς μεγάλη ποσότητα βιταμίνης Β12 που προσλαμβάνεται έτοιμη με την τροφή (π.χ. κυανοκοβαλαμίνη) καταστρέφεται από τη μικροχλωρίδα (Girard et al., 2009). Επιπλέον, απαιτείται η φυσιολογική λειτουργία του ηνύστρου ώστε να μπορέσει να γίνει η πέψη των πρωτεϊνούχων τροφών και η αποδέσμευση της βιταμίνης Β12 καθώς και η παραγωγή του ενδογενούς παράγοντα, η ύπαρξη του οποίου έχει αποδειχθεί μόνο στα βοοειδή και όχι στα πρόβατα και τις αίγες (Haplin et al., 1984). Ακόμη, απαραίτητη είναι η φυσιολογική λειτουργία του παγκρέατος και η έκκριση των πρωτεασών για την πέψη των πρωτεϊνών και την αποδέσμευση της βιταμίνης Β12 και τέλος η φυσιολογική λειτουργία του ειλεού για την απορρόφησή της (McDowell, 2000).

Η παρουσία των «αναλόγων» της κοβαλαμίνης φαίνεται να παίζει ρόλο στην απορρόφησή της. Ωστόσο, ο ρόλος αυτός δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένος, καθώς αναφέρεται ότι τα «ανάλογα» της κοβαλαμίνης

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

βοηθούν στην απορρόφηση της «πραγματικής» Β12 αλλά φαίνεται ότι δρουν και ως αναστολείς της δράσης της. Σημειώνεται ότι τα «ανάλογα» της κοβαλαμίνης στο πλάσμα των βοοειδών μπορεί να αποτελούν έως και το 50% της συνολικής ποσότητας της Β12 που υπάρχει στην κυκλοφορία του αίματος, ενώ στα πρόβατα δεν ανιχνεύονται (Haplin et al., 1984).

Τα όργανα στα οποία αποθηκεύεται η βιταμίνη Β12 είναι κυρίως το ήπαρ, αλλά και οι νεφροί, η καρδιά, ο σπλήνας και ο εγκέφαλος. Η αποθηκευμένη ποσότητα της βιταμίνης Β12 εξαρτάται άμεσα από την προσλαμβανόμενη ποσότητα κοβαλτίου. Σε πρόβατα που προσλαμβάνουν επαρκή ποσότητα κοβαλτίου, η μεγαλύτερη ποσότητα στον οργανισμό, βρίσκεται με μορφή της βιταμίνης Β12, στο ήπαρ. Σε περίπτωση ανεπαρκούς πρόσληψης κοβαλτίου, η ποσότητα της βιταμίνης Β12 στο ήπαρ μειώνεται ταχύτατα και μόνο το ένα τρίτο της ποσότητας του κοβαλτίου βρίσκεται με τη μορφή της βιταμίνης Β12 στο ήπαρ (Andrews et al., 1960).

Η αποβολή της βιταμίνης Β12 γίνεται κυρίως μέσω της χολής, και επαναρροφάται από τον ειλεό. Οι γαλακτοπαραγωγές αγελάδες εκκρίνουν το 85-87,5% του συνολικού αποβαλλόμενου κοβαλτίου στα κόπρανα, ένα μικρό ποσοστό στα ούρα και το υπόλοιπο στο γάλα (McDowell, 2000).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

1.1.3. Λειτουργίες

Η βιταμίνη Β12 παίρνει μέρος σε διάφορες μεταβολικές λειτουργίες. Οι λειτουργίες αυτές έχουν να κάνουν με τη σύνθεση της πουρίνης και της πυριμιδίνης, τη μεταφορά των μεθυλομάδων, τη σύνθεση των πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας τα αμινοξέα και το μεταβολισμό των λιπών και των υδατανθράκων. Η κύρια όμως λειτουργία της βιταμίνης Β12 είναι η προώθηση της σύνθεσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων και η διατήρηση της ακεραιότητας του νευρικού συστήματος, που επηρεάζονται σε περίπτωση έλλειψής της (McDowell, 2000).

Πρωταρχικός ρόλος της βιταμίνης Β12 είναι να δρα ως συνένζυμο στη σύνθεση και το σχηματισμό της μεθειονίνης, η οποία με τη σειρά της επιδρά στον φυσιολογικό μεταβολισμό του φολικού οξέος. Έτσι η ανεπάρκεια της βιταμίνης Β12 οδηγεί σε δευτερογενή ανεπάρκεια του φολικού οξέος και σε δυσλειτουργία της ερυθροποίησης. Επιπλέον, η πουρίνη και η πυριμιδίνη είναι απαραίτητες στο μιτωτικό ρυθμό. Για το λόγο αυτό, μειωμένη συγκέντρωση της βιταμίνης Β12 οδηγεί σε αδυναμία συγχρονισμού ανάμεσα στην ωρίμανση του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος (Federici et al., 2007; Koury and Ponka, 2004; McDowell, 2000).

Η διαθεσιμότητά της για τη μεταφορά της μεθυλομάδας επηρεάζει τη σύνθεση των πουρινών και των πυριμιδών, τα οποία είναι συστατικά του DNA και του RNA. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, τα ταχέως διαχωριζόμενα κύτταρα και κυρίως τα ερυθρά αιμοσφαίρια, να επηρεάζονται υπερβολικά από τη διαθεσιμότητα της βιταμίνης Β12 αλλά και τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

και των όρχεων (Federici et al., 2007; McDowell, 2000). Και το νευρικό όμως σύστημα είναι ευαίσθητο στην ανεπάρκεια της βιταμίνης λόγω του υψηλού μεταβολικού ρυθμού. Η ανεπάρκεια της βιταμίνης επηρεάζει και την ανάπτυξη στους αμνούς (Andrews et al., 1960), πιθανώς μέσω της μείωσης του ρυθμού της σύνθεσης των πρωτεϊνών.

Επιπλέον, η βιταμίνη Β12 σχετίζεται με την ανοσολογική λειτουργία του οργανισμού, όπως φαίνεται σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε αμνούς, όπου παρατηρήθηκαν μειωμένες συγκεντρώσεις ανοσοσφαιρίνης IgG στον ορό και μειωμένη συγκέντρωση ολικών πρωτεϊνών σε ζώα που είχαν έλλειψη κοβαλτίου (Fisher, 1991).

Τέλος, η ανεπάρκεια της βιταμίνης Β12 μπορεί να οδηγήσει σε ένα φαύλο κύκλο, μειωμένης πρόσληψης κοβαλτίου- σύνθεσης βιταμίνης Β12. Αυτό συμβαίνει γιατί η βιταμίνη Β12 παίζει ρόλο στο μεταβολισμό του προπιονικού οξέος στη μεγάλη κοιλία κατά τη διάρκεια της ζύμωσης των υδατανθράκων. Σε ανεπάρκεια της βιταμίνης, το προπιονικό οξύ συσσωρεύεται στο αίμα γιατί δεν απομακρύνεται με τον ίδιο ρυθμό από την κυκλοφορία του αίματος, το οποίο σχετίζεται αντιστρόφως ανάλογα με την όρεξη για την πρόσληψη τροφής (McDowell, 2000).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

1.1.4. Ανάγκες

Οι ανάγκες του οργανισμού σε βιταμίνη Β12 είναι μικρές, μόλις μερικά μικρογραμμάρια ανά κιλό προσλαμβανόμενης ποσότητας τροφής, ενώ στα ενήλικα μηρυκαστικά δεν είναι απαραίτητη η πρόσληψή της με την τροφή, αφού παράγεται στη μεγάλη κοιλία. Οι απαιτήσεις του οργανισμού εξαρτώνται και από άλλους παράγοντες, όπως η αυξημένη παραγωγή πρωτεϊνών, όπου σ' αυτή την περίπτωση αυξάνονται και οι απαιτήσεις σε βιταμίνη Β12 ή η συγκέντρωση διαφόρων θρεπτικών συστατικών (McDowell, 2000).

Η σύνθεση της βιταμίνης Β12 στη μεγάλη κοιλία μειώνεται όταν η προσλαμβανόμενη ποσότητα κοβαλτίου είναι μειωμένη, όπως σε περίπτωση που οι λειμώνες που είναι φτωχοί σε κοβάλτιο (McDowell, 2000). Αντίθετα, αύξηση της χορηγούμενης ποσότητας κοβαλτίου από 0,1 σε 1,0 mg/kg τροφής, οδηγεί σε αύξηση της συντιθέμενης ποσότητας της βιταμίνης Β12 (Tiffany et al., 2006).

Στα νεαρά μηρυκαστικά, είναι απαραίτητη η εξωγενής πρόσληψη της βιταμίνης Β12, μέσω του γάλακτος. Αυτό ισχύει μέχρι να αρχίσει η λήψη ξηράς τροφής και η σύνθεση της βιταμίνη Β12, δηλαδή περίπου στην ηλικία των 6-8 εβδομάδων στους μόσχους, ανάλογα με το πρόγραμμα απογαλακτισμού που ακολουθεί κάθε εκτροφή. Η συγκέντρωση της βιταμίνης Β12 είναι σημαντικά μειωμένη στο παραγόμενο γάλα των αγελάδων, σε σύγκριση με τη συγκέντρωση στο πρωτόγαλα , και συνεχίζεται η μείωσή της με την πάροδο των ημερών (Duplessis et al., 2015). Οι ανάγκες των αγελάδων γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης σε βιταμίνη Β12 υπολογίζονται

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

σε 0,34-0,68 μg/kg σωματικού βάρους και οι απαιτήσεις ενός μόσχου γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης υπολογίζονται σε 20-40 μg/kg ξηράς ουσίας (Radostits and Bell, 1970).

Εκτός από την ίδια την ποσότητα του κοβαλτίου που προσλαμβάνεται, σημαντικό ρόλο παίζει και η σύνθεση του σιτηρεσίου. Έτσι, για παράδειγμα σε αγελάδες που τους χορηγήθηκε περιορισμένη ποσότητα άχυρου, σημειώθηκε αύξηση της συγκέντρωσης της βιταμίνης Β12 στο περιεχόμενο της μεγάλης κοιλίας, στον ορό του αίματος, μείωση της συγκέντρωσης στο γάλα και στο ήπαρ και αύξηση της απέκκρισης με τα ούρα σε σύγκριση με αγελάδες που τους χορηγήθηκε απεριόριστη ποσότητα άχυρου (Walker and Elliot, 1972). Άλλοι λόγοι μείωσης της συντιθέμενης βιταμίνης, μπορεί να είναι το πλούσιο σε μαγνήσιο σιτηρέσιο (Smit et al., 1999), ή οι υψηλά συμπυκνωμένες τροφές, οι οποίες ενισχύουν και την παραγωγή αναλόγων της βιταμίνης με μικρή έως μηδενική δράση (Sutton and Elliot, 1972).

1.1.5. Ανεπάρκεια

Ανεπάρκεια της βιταμίνης Β12 υπάρχει σε νεαρά μηρυκαστικά, στα οποία δεν έχει αρχίσει να συντίθεται ακόμα βιταμίνη από τη μικροχλωρίδα της μεγάλης κοιλίας και δεν επαρκεί η προσλαμβανόμενη ποσότητα για τις ανάγκες του οργανισμού. Γενικά θεωρείται ότι τα πρόβατα και κυρίως οι αμνοί είναι τα πιο ευαίσθητα στην έλλειψη κοβαλτίου, σε σύγκριση με τις αίγες και τα βοοειδή (Mburu et al., 1993).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Η ανεπάρκεια στο κοβάλτιο και τη βιταμίνη Β12 μπορεί να έχει διάφορες επιπτώσεις στην υγεία των ζώων, όπως είναι το να γίνονται πιο επιρρεπή σε παρασιτώσεις (Suttle and Jones, 1989). Σε μέτρηση του αριθμού των αυγών των νηματωδών παρασίτων στα κόπρανα διαπιστώθηκε μεγαλύτερος αριθμός σε αμνούς με μειωμένη συγκέντρωση βιταμίνης Β12 στον ορό του αίματος σε σύγκριση με την ομάδα των υγιών. Στα ίδια ζώα ύστερα από πειραματική χορήγηση του εμβολίου έναντι του *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*, παρατηρήθηκε μειωμένη ανταπόκριση των λεμφοκυττάρων (Vellema et al., 1996).

Σχετικά με το ρόλο της βιταμίνης Β12 στη σύνθεση της μεθειονίνης, διαπιστώθηκε πειραματικά σε αγελάδες στις οποίες χορηγήθηκε σιτηρέσιο με χαμηλή περιεκτικότητα σε κοβάλτιο μειωμένη όρεξη, μείωση της συγκέντρωσης της Β12 στον ορό του αίματος και μείωση της συγκέντρωσης της μεθειονίνης περίπου στο μισό (Stangl et al., 2000). Σε άλλη μελέτη που έγινε πάλι σε αγελάδες διαπιστώθηκε ότι όταν χορηγούνται σε συνδυασμό με βιταμίνη Β12 και φολικό οξύ στην αρχή της γαλακτοπαραγωγής υπήρχε αύξηση στο παραγόμενο γάλα και βελτίωση των συστατικών του (Girard and Matte, 2005).

Η μειωμένη πρόσληψη κοβαλτίου από τις προβατίνες είχε ως αποτέλεσμα τη χαμηλή συγκέντρωση βιταμίνης Β12 στον ορό των αμνών, τη φωτοευαισθησία των αμνών, τη γέννηση θνησιγενών αμνών και τη μειωμένη συγκέντρωση IgG ανοσοσφαιρίνης στον ορό (Fisher, 1991) Σε αίγες με έλλειψη κοβαλτίου, τα συμπτώματα είναι πολύ πιο ήπια από των προβάτων,

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

εμφανίζοντας ήπια αναιμία και μείωση της βιταμίνης Β12 στο ορό του αίματος (McDowell, 2000).

Στην έλλειψη κοβαλτίου οφείλεται και η νόσος του ωχρού ήπατος των προβάτων, κατά την οποία τα ζώα εμφανίζουν απίσχναση και λιποείδωση του ήπατος. Κατά τη νεκροψία, το ήπαρ είναι διογκωμένο, εύθραυστο και ωχρό (Kennedy et al., 1997).

Τα ζώα με ανεπάρκεια κοβαλτίου και συνεπώς και βιταμίνης Β12 εμφανίζουν μη ειδικά συμπτώματα όπως είναι η μειωμένη όρεξη, η απώλεια βάρους, η μυϊκή αδυναμία, το ξηρό τρίχωμα, η αναιμία και αν δεν διαπιστωθεί έγκαιρα το αίτιο ώστε να εφαρμοστεί η κατάλληλη θεραπεία, επέρχεται ο θάνατος.

Η διαφορική διάγνωση της ανεπάρκειας σε κοβάλτιο από τον απλό υποσιτισμό ή τον παρασιτισμό είναι πολλές φορές δύσκολη λόγω των γενικών συμπτωμάτων που εμφανίζουν τα ζώα (McDowell, 2000).

1.1.6. Τοξίκωση

Τα ζώα μπορούν να ανεχτούν μεγάλες ποσότητες βιταμίνης Β12. Τα συμπτώματα της τοξίκωσης είναι ακαθόριστα. Στο κοβάλτιο το όριο τοξίκωσης είναι 10mg/kg ΣΒ. Χαρακτηριστικά της τοξίκωσης από κοβάλτιο στα περισσότερα είδη είναι η μείωση της όρεξης και του σωματικού βάρους, η αναιμία και η αύξηση της συγκέντρωσης του κοβαλτίου στο ήπαρ. Στις αγελάδες, η τοξίκωση από κοβάλτιο χαρακτηρίζεται από πολυουρία, αύξηση

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

των παραγόμενων κοπράνων χωρίς μεταβολή στη σύστασή τους και σιελόρροια και δυσκολία στην αναπνοή και στη γενική εξέταση του αίματος παρατηρείται πολυκυτταραιμία, αύξηση της αιμοσφαιρίνης, του αριθμού των ερυθρών αιμοσφαιρίων και του όγκου τους (Resources., 2001).

1.2. Ηλικία

Όπως προαναφέρθηκε, η ηλικία είναι από τους παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τις τιμές των αιματολογικών παραμέτρων. Σύμφωνα με τον (Mohri et al., 2007) ο αιματοκρίτης στους νεογέννητους μόσχους μειώνεται μέχρι την 28^{η} ημέρα και στη συνέχεια αυξάνεται. Διαφορές ανάμεσα στα νεαρά και τα ενήλικα βοοειδή υπάρχουν και στα λευκά αιμοσφαίρια, όπου αν και ο συνολικός αριθμός τους δεν διαφέρει, ο αριθμός των επιμέρους κυττάρων διαφέρει αισθητά. Έτσι, στους νεογέννητους μόσχους, το ποσοστό των ουδετερόφιλων είναι μεγαλύτερο από αυτό των λεμφοκυττάρων και ο απόλυτος αριθμός τους είναι υψηλότερος από το ανώτερο όριο των τιμών αναφοράς των ενηλίκων. Μέσα στην πρώτη εβδομάδα, τα ουδετερόφιλα αρχίζουν να μειώνονται και να αυξάνονται τα λεμφοκύτταρα και λιγότερο τα μονοκύτταρα (Brun-Hansen et al., 2006; Mohri et al., 2007). Ενώ και στις δύο προηγούμενες μελέτες ο αριθμός των αιμοπεταλίων αυξήθηκε απότομα την δεύτερη εβδομάδα της ζωής τους, στη μία αναφέρεται ότι παρέμεινε σταθερός μέχρι και την 84^{η} ημέρα (Mohri et al., 2007), ενώ στην άλλη μελέτη, ο αριθμός

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

τους αρχίζει να μειώνεται μέχρι την ηλικία των 10-12 εβδομάδων, όπου και βρίσκεται πλέον μέσα στα όρια αναφοράς των ενηλίκων (Brun-Hansen et al., 2006).

2. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Με βάση τα παραπάνω προκύπτει ότι η βιταμίνη Β12 παίζει βασικό ρόλο στην αιμοποίηση. Οι ανάγκες στη βιταμίνης Β12 καλύπτονται από τη σύνθεση στη μεγάλη κοιλία μετά την έναρξη της λειτουργίας των προστομάχων. Η ηλικία των μηρυκαστικών επηρεάζει τις αιματολογικές παραμέτρους. Ωστόσο, δεν έχει διερευνηθεί πλήρως η συσχέτιση μεταξύ των μεταβολών των τιμών των αιματολογικών παραμέτρων προϊούσης της ηλικίας με τις συγκεντρώσεις της βιταμίνης Β12 στα βοοειδή.

Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν α) η σύγκριση των συγκεντρώσεων της βιταμίνης Β12 και των τιμών των αιματολογικών παραμέτρων πριν και μετά τον απογαλακτισμό σε μόσχους κρεοπαραγωγικής κατεύθυνσης και β) η διερεύνηση πιθανής συσχέτισης ανάμεσα στη συγκέντρωση της βιταμίνης Β12 στο αίμα των κρεοπαραγωγικών μόσχων και των τιμών των αιματολογικών τους παραμέτρων.

Πριν την έναρξη της μελέτης, υπολογίστηκε ο ελάχιστος αριθμός δειγμάτων

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

που θα έπρεπε να συλλεχθεί, χρησιμοποιώντας το λογισμικό General Linear Multivariate Model with Wilks Likelihood Ratio procedure στο λογισμικό GLIMMPSE (http://glimmpse.samplesizeshop.org/). Η επιθυμητή ισχύς ορίστηκε στο 0.8, το ποσοστό λάθους τύπου Ι, στο 0,05 και η επιθυμητή ανιχνεύσιμη διαφορά της συγκέντρωσης της βιταμίνης B_{12} ανάμεσα στις ομάδες ορίστηκε το 50, με τυπική απόκλιση 50. Ο συντελεστής κλίμακας των μέσων και ο συντελεστής κλίμακας μεταβλητότητας ορίστηκαν στο 1. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν ότι ο ελάχιστος αριθμός δειγμάτων που απαιτείται είναι 34 ζώα, με 17 ζώα σε κάθε ομάδα (Power=0,807).

3. ΜΕΘΟΔΟΙ- ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Ολικό αίμα συλλέχθηκε από 31 μόσχους πριν τον απογαλακτισμό, ηλικίας 2-3 εβδομάδων και από 31 απογαλακτισμένους μόσχους ηλικίας 15-16 εβδομάδων. Όλοι οι μόσχοι ήταν της φυλής Limousin, που γεννήθηκαν και μεγάλωσαν στην ίδια εκτροφή. Πριν τον απογαλακτισμό, όλοι οι μόσχοι βρίσκονταν με τη μητέρα τους, είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε καθαρό νερό καθώς και σε καλής ποιότητας άχυρο και συμπυκνωμένη τροφή για κατανάλωση σε απεριόριστη ποσότητα. Σύμφωνα με το πρόγραμμα της εκτροφής, ο απογαλακτισμός γίνεται στην ηλικία των 12 εβδομάδων. Μετά τον απογαλακτισμό, εκτρέφονται σε ομάδες των 6 μόσχων. Η διατροφή τους αποτελούνταν από 50% άχυρο και 50% συμπυκνωμένη τροφή εμπορίου.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Στους **Πίνακες 3** και **4** φαίνεται η σύνθεση της συμπυκνωμένης τροφής που χορηγήθηκε στους μόσχους πριν και μετά τον απογαλακτισμό.

Πίνακας 3. *Ανάλυση των θρεπτικών συστατικών της τροφής που χρησιμοποιήθηκε στους μόσχους πριν τον απογαλακτισμό*

Ανάλυση θρεπτικών στοιχείων εναρκτήριας τροφής μόσχων (επί ξηράς ουσίας)	
Ολικές πρωτεΐνες	15,50 %
Ολικές λιπαρές ουσίες	12,00 %
Ολικές ινώδεις ουσίες	2,00 %
Ολική τέφρα	6,88 %
Ασβέστιο	0,60%
Φωσφόρος	0,58%
Νάτριο	0,16 %
Μαγνήσιο	0,29%
Βιταμίνη A (E672)	15000 IU/kg
Βιταμίνη D3 (E671)	3000 IU/kg
Ιωδικό Ασβέστιο (E2)	177,70 mg/kg
Πεντένυδρος Θειικός Χαλκός (E4)	9,00 mg/kg
Ένυδρος Θειικός Σίδηρος (E1)	30,20 mg/kg
Σεληνιώδες Νάτριο (E8)	0,40 mg/kg
Οξείδιο του Μαγγανίου (E5)	22,30 mg/kg
Ανθρακικό Κοβάλτιο (3b304)	0,60 mg/kg
Ένυδρος Θειικός Ψευδάργυρος(E6)	0,80 mg/kg
Οξείδιο του Ψευδαργύρου (E6-Zinc)	59,20 mg/kg
Εθοξυκουίνη (E324)	5,00 mg/kg

(RUMITO START)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Πίνακας 4. *Σύνθεση και ανάλυση των θρεπτικών συστατικών της συμπυκνωμένης τροφής που προσφέρεται ad libitum στους μόσχους μετά τον απογαλακτισμό*

Συστατικά	
Σογιάλευρο (%)	25,00
Καλαμπόκι (%)	40,00
Πίτυρα σίτου (%)	10,00
Κριθάρι (%)	21,00
Διττανθρακικό Νάτριο (%)	1,5
Πρόμιγμα βιταμινών και ιχνοστοιχείων (%)*	2,5
Ανάλυση	
Ολικές Πρωτεϊνες (%)	19,17
Καθαρή Ενέργεια (Mcal/kg)	1,48
Ασβέστιο (%)	0,59
Φωσφόρος (%)	0,45

**Πρόσθετα ανά kg:* βιταμίνη A 800.000 IU; βιταμίνη D_3 160.000 IU; βιταμίνη E 4.000 mg; νικοτινικό οξύ 10.000 mg; Co 20 mg; I 100 mg; Se 18 mg; Mn 3200 mg; Zn 8000 mg; Cu 800 mg. *Χημική ανάλυση*: Ca 19,50%; Na 5,20%; P 5,85%; Mg 1,1%. (ALFAPLUS 842)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Δυο μέρες πριν τη δειγματοληψία, συλλέχθηκαν κόπρανα από 10 μόσχους ηλικίας 15-16 εβδομάδων για την διενέργεια παρασιτολογικής εξέτασης, στην οποία δεν ανευρέθηκαν ενδοπαράσιτα. Την ημέρα της αιμοληψίας, έγινε κλινική εξέταση σε όλα τα ζώα και ελέγχθηκαν για την παρουσία εξωπαρασίτων. Όλα τα ζώα που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη ήταν κλινικώς υγιή, χωρίς να έχουν διάρροια ή συμπτώματα από το αναπνευστικό και δεν ανιχνεύτηκαν εξωπαράσιτα.

Οι αιμοληψίες πραγματοποιήθηκαν με βελόνες 20 G μιας χρήσης και με ειδικούς περιέκτες κενού χωρητικότητας 5 ml, με αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικού νάτριου 3,8% που προμήθευσε η παρασκευάστρια εταιρεία. Σε όλα τα δείγματα αίματος προσδιορίσθηκαν ο αιματοκρίτης, η αιμοσφαιρίνη, ο αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων και αιμοπεταλίων στον αναλυτή VetAutoread® Hematology Analyzer, IDEXX σύμφωνα με την ειδική για το ζωικό αυτό είδος μεθοδολογία που προτείνεται από την κατασκευάστρια εταιρεία IDEXX (Idexx, 2008). Τα δείγματα μεταφέρθηκαν άμεσα στο Διαγνωστικό Εργαστήριο της Παθολογικής Κλινικής του Τμήματος Κτηνιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Τα δείγματα είχαν τοποθετηθεί σε φορητό δοχείο ψύξης με παγοκύστες, οι οποίες όμως δεν έρχονταν σε άμεση επαφή με τα φιαλίδια. Η παρασκευή των επιχρισμάτων αίματος έγινε άμεσα, ώστε να προσδιοριστεί ο λευκοκυτταρικός τύπος και η εκτίμηση της μορφολογίας των κυττάρων του αίματος. Μετά τη μονιμοποίηση έγινε χρώση Giemsa.

Μετά τη φυγοκέντρηση, οι οροί μεταφέρθηκαν με παγοκύστεις σε πιστοποιημένο κατά ISO κτηνιατρικό διαγνωστικό εργαστήριο (Vet in progress

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

plus), τοποθετήθηκαν στην κατάψυξη, στους -20^{o}C και αναλύθηκαν μέσα σε 2 μέρες από την αιμοληψία όπως και σε προηγούμενη μελέτη όπου προσδιορίστηκε η σταθερότητα κάτω από παρόμοιες συνθήκες συντήρησης (Drammeh et al., 2008). Η συγκέντρωση της βιταμίνης B12 έγινε με αυτόματη ανοσοχημειοφωταύγεια (Immulite 1000, Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, USA).

Η συγκέντρωση των ολικών πρωτεϊνών του ορού (total protein, TP) προσδιορίστηκε με τη χρήση του διαθλασίμετρου, (Reichert TS Meter refractometer, Model 1310400A, Reichert Scientific Instruments Buffalo, NY, USA), σύμφωνα με προηγούμενα αξιολογημένη μέθοδο (Katsoulos et al., 2017). Η συγκέντρωση των λευκωματινών στον ορό προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της πράσινης βρωμοκρεσόλης, σε αυτοματοποιημένο βιοχημικό αναλυτή (Vitalab Flexor E, Vital Scientific N.V, The Netherlands) χρησιμοποιώντας εμπορικό διαγνωστικό αντιδραστήριο (ThermoFisher Scientific Inc. VA, USA).

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε χρησιμοποιώντας το στατιστικό πρόγραμμα IBM SPSS Statistics 25. Ο έλεγχος της κανονικότητας της κατανομής έγινε με τεστ Kolmogorov-Smirnov. Ο παραμετρικός έλεγχος του t-test με ανεξάρτητα δείγματα χρησιμοποιήθηκε ώστε να προσδιοριστεί η σημαντικότητα των διαφορών των τιμών των αιματολογικών παραμέτρων σε μόσχους πριν και μετά τον απογαλακτισμό και κάθε παραμέτρου που ακολουθούσε την κανονική κατανομή , ενώ ο μη παραμετρικός έλεγχος Mann Whitney U test χρησιμοποιήθηκε για τις παραμέτρους που δεν είχαν κανονική κατανομή. Η γραμμική συσχέτιση ανάμεσα στη συγκέντρωση της βιταμίνης

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

B12 και των άλλων παραμέτρων έγινε με το συντελεστή συσχέτισης του Pearson και του Spearman Rho (Akoglu, 2018; Bland and Altman, 1986), ανάλογα αν τα δεδομένα ακολουθούσαν ή όχι την κανονική κατανομή, αντίστοιχα. Η σημαντικότητα ορίστηκε κάτω από 0,05 (P≤0,05) σε όλες τις συγκρίσεις.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από την ανάλυση των δεδομένων διαπιστώθηκε στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερη συγκέντρωση της βιταμίνης B12, υψηλότερος αιματοκρίτης, και μεγαλύτερη συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης, μεγαλύτερος αριθμός των αιμοπεταλίων και των λεμφοκυττάρων, ενώ υπήρξε σημαντικά μικρότερος αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων, αριθμός ουδετεροφίλων, ώριμων και άωρων, όπως και εωσινοφίλων και μονοκυττάρων **(Πίνακας 5)**.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Πίνακας 5. *Μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα του μέσου όρου της βιταμίνης Β12 και των αιματολογικών παραμέτρων στους μη- απογαλακτισμένους και στους απογαλακτισμένους μόσχους*

Παράμετρος	Μη- απογαλακτισμένοι μόσχοι	Απογαλακτισμένοι μόσχοι
B12 (pg/ml)	123,68±3,07[a]	304,65±21,39[b]
TP (g/dL)	5,83±0,18[a]	6,09±0,24[a]
ALB (g/dL)	2,83±0,095[a]	2,58±0,05[a]
HCT (%)	28,22±0,77[a]	33,44±0,95[b]
HGB (gr/dL)	9,37±0,257[a]	11,12±0,32[b]
MCV (fL)	33,04±0,85[a]	33,76±0,79[a]
PLT (μl^{-1})	625727,97±61152,57[a]	845191,49±48699,12[b]
WBC (μl^{-1})	10754,84±682,47[a]	8000,00±385,68[b]
NEU (μl^{-1})	5912,35±470,54[a]	1968,55±117,05[b]
BAND (μl^{-1})	157,64±18,82[a]	77,49±12,38[b]
LYMPH (μl^{-1})	3995,45±164,03[a]	5572,35±286,39[b]
MONO (μl^{-1})	397,06±38,63[a]	233,80±23,02[b]
EOS (μl^{-1})	246,96±29,68[a]	103,00±10,44[b]
BASO (μl^{-1})	45,35±10,85[a]	44,80±9,26[a]

*Οι τιμές με διαφορετικό δείκτη υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντική διαφορά

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Η διαφορά μεταξύ της συγκέντρωσης βιταμίνης Β12 πριν και μετά τον απογαλακτισμό μπορεί να αποδοθεί στην ανεπαρκή πρόσληψη βιταμίνης Β12 από νεογέννητα καθώς δεν διαθέτουν σε αυτή την ηλικία μικροχλωρίδα της μεγάλης κοιλίας και συνεπώς θα πρέπει όλη η απαιτούμενη ποσότητα να προσληφθεί μέσω του γάλακτος. Η συγκέντρωση της βιταμίνης Β12 είναι σημαντικά υψηλότερη στο πρωτόγαλα σε σχέση με το γάλα και μάλιστα η μείωση της συγκέντρωσης στο γάλα συνεχίζεται με την πάροδο των ημερών (Duplessis et al., 2015) τόσο στο γάλα των προβάτων (Gruner et al., 2004) όσο και των βοοειδών (Anthony et al., 1951). Επιπλέον, στις περιπτώσεις όπου χρησιμοποιήθηκε υποκατάστατο γάλακτος σε μόσχους, η πρόσληψη βιταμίνης Β12 δεν ήταν η βέλτιστη ώστε να μπορέσουν να διατηρηθούν τα αποθέματα της βιταμίνης Β12 (Grace et al., 2014). Σε αντίθεση με τα ευρήματα της παρούσας μελέτης, καθώς και με τις μελέτες που αναφέρθηκαν παραπάνω, δεν έχουν αναφερθεί διαφορές πριν και μετά τον απογαλακτισμό, σε αμνούς. Οι συγγραφείς αποδίδουν αυτά τα αποτελέσματα στα αυξημένα ηπατικά αποθέματα της βιταμίνης Β12 που θα μπορούσαν να έχουν ρυθμίσει την επίδραση στη συγκέντρωση βιταμίνης Β12 πριν και μετά τον απογαλακτισμό, μέσω της πρόσληψης της βιταμίνης με το γάλα και της σύνθεσή της στη μεγάλη κοιλία, αντίστοιχα (Knowles and Grace, 2017).

Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στον αριθμό των ερυθρών αιμοσφαιρίων και τη συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης στην παρούσα μελέτη πριν και μετά τον απογαλακτισμό συμφωνούν με προηγούμενες αναφορές στη μεταβολή της συγκέντρωσης της αιμοσφαιρίνης σε σχέση με την πορεία της ηλικία (Reece and Hotchkiss, 1987; Scheidegger, 1973; Steinhardt et al., 1993). Είναι

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

γνωστό ότι αρχικά παρατηρείται αύξηση στον αιματοκρίτη των νεογέννητων μόσχων, λόγω της υποξίας που προκλήθηκε κατά τη γέννησή τους (Steinhardt et al., 1993) ενώ στη συνέχεια μείωση του αριθμού των ερυθρών αιμοσφαιρίων που περιέχουν εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη κατά τις πρώτες εβδομάδες μετά τον τοκετό, λόγω της αντικατάστασης τους από ερυθρά αιμοσφαίρια που περιέχουν την αιμοσφαιρίνη των ενηλίκων (Scheidegger, 1973). Επιπλέον, η αύξηση του αιματοκρίτη και της συγκέντρωσης της αιμοσφαιρίνης που σημειώθηκε στην παρούσα μελέτη μετά τον απογαλακτισμό, έχει αναφερθεί και από τους Reece and Hotchkiss (Reece and Hotchkiss, 1987) οι οποίοι διατύπωσαν την άποψη ότι οι μεταβολές στις αιματολογικές παραμέτρους σε σχέση με την ηλικία επηρεάζονται από τα συστήματα διατροφής και εκτροφής.

Όσον αφορά τον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων, έχουν αναφερθεί παρόμοια ευρήματα με αυτά της παρούσας μελέτης, όπως το υψηλότερο ανώτερο όριο αναφοράς στους νεογέννητους μόσχους σε σύγκριση με το ανώτερο όριο αναφοράς των ενήλικων (Panousis et al., 2019). Η ταυτόχρονη αύξηση του αριθμού των λεμφοκυττάρων και η μείωση του αριθμού των ουδετερόφιλων που οδηγεί σε μείωση της αναλογίας ουδετερόφιλων/λεμφοκυττάρων, σε αντίθεση με τα περισσότερα άλλα είδη όπου τα ουδετερόφιλα κυριαρχούν των λευκών αιμοσφαιρίων, έχει επίσης αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες (Panousis et al., 2019; Wood and Quiroz-Rocha, 2010). Η μείωση του αριθμού των εωσινοφίλων και των μονοκυττάρων προϊούσας της ηλικίας είναι σύμφωνη με προηγούμενες αναφορές (Wood and Quiroz-Rocha, 2010). Ο αριθμός των αιμοπεταλίων

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

ήταν υψηλότερος στους νεογέννητους μόσχους έως την ηλικία των 9 ημερών σε σύγκριση με τον αριθμό των αιμοπεταλίων των ενηλίκων (Panousis et al., 2019). Αύξηση παρατηρήθηκε και στην παρούσα μελέτη, αν και δεν έγινε σύγκριση μεταξύ νεαρών και ενήλικων ζώων αλλά σε μόσχους δύο διαφορετικών ηλικιών.

Ισχυρή θετική συσχέτιση διαπιστώθηκε μεταξύ της συγκέντρωσης της βιταμίνης Β12 και του αιματοκρίτη και της συγκέντρωσης της αιμοσφαιρίνης πριν από τον απογαλακτισμό, ενώ οι συσχετίσεις αυτές ήταν μέτρια θετικές μετά τον απογαλακτισμό καθώς και στον συνολικό πληθυσμό που εξετάστηκε. Όσον αφορά τον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων και τον αριθμό των λεμφοκυττάρων, παρατηρήθηκε μέτρια θετική συσχέτιση μετά τον απογαλακτισμό και στον συνολικό πληθυσμό, αντίστοιχα. Όσον αφορά όλους τους άλλους πληθυσμούς των κυττάρων του αίματος, είτε δεν υπήρξε συσχέτιση με τη συγκέντρωση βιταμίνης Β12, είτε αυτός ο συσχετισμός ήταν ασθενής **(Πίνακας 6)**. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ασθενής θετική συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης της βιταμίνης Β12 και των ολικών πρωτεϊνών πριν από τον απογαλακτισμό και της συγκέντρωσης των λευκωματινών μετά τον απογαλακτισμό. Ο λόγος που έγινε συσχέτιση των αιματολογικών παραμέτρων με τις ολικές πρωτεΐνες και τις λευκωματίνες ήταν οι αναφορές προηγούμενων μελετών θετικής συσχέτισης των συγκεντρώσεών τους και της συγκέντρωσης της βιταμίνης Β12 σε αμνούς (Fisher, 1991) και στον άνθρωπο (Bowen et al., 2006).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Πίνακας 6. *Συντελεστές συσχέτισης (R) μεταξύ της βιταμίνης Β12 και των αιματολογικών παραγόντων στο σύνολο των μόσχων που ελέγχθηκαν, στους μόσχους μη- απογαλακτισμένους και στους απογαλακτισμένους μόσχους*

B12			
	Σύνολο	**Μη- απογαλακτισμένοι μόσχοι**	**Απογαλακτισμένοι μόσχοι**
TP	0,16	0,44*	0,10
ALB	-0,05	0,33	0,45*
HCT	0,65**	0,81**	0,55**
HGB	0,65**	0,81**	0,55**
MCV	0,07	0,28	-0,03
PLT	0,07	0,12	-0,49**
WBC	-0,20	0,02	0,55**
NEU	-0,67**	0,02	0,49**
BAND	-0,41**	-0,27	0,07
LYMPH	0,55**	0,10	0,39*
MONO	-0,41**	-0,10	-0,19
EOS	-0,53**	-0,13	-0,07
BASO	0,17	0,47**	0,13

**P<0,01
*P<0,05

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Ο ρόλος της βιταμίνης Β12 στην αιμοποίηση είναι καλά τεκμηριωμένος. Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης, παρέχουν ενδείξεις πιθανής συμβολής της βιταμίνης Β12 σε παρατηρούμενες διαφορές στις αιματολογικές παραμέτρους των μόσχων, ανάλογα με την ηλικία τους. Ωστόσο, ακόμη και σε περιπτώσεις που διαπιστώνεται ισχυρή συσχέτιση, δεν τεκμηριώνεται σχέση αιτίου-αποτελέσματος (Bland and Altman, 1986).

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά, η συγκέντρωση της βιταμίνης Β12 στους μόσχους επηρεάζεται από την ηλικία και φαίνεται να σχετίζεται με την έναρξη της ενδογενούς παραγωγής της από τη μικροβιακή χλωρίδα της μεγάλης κοιλίας. Παράλληλα, φαίνεται να συμβάλλει στις διαφορές που παρατηρούνται στις αιματολογικές παραμέτρους σε διαφορετικές ηλικιακές περιόδους, χωρίς να παραβλέπεται η συμβολή και άλλων παραγόντων όπως η φυλή των ζώων, τα συστήματα εκτροφής, οι γεωγραφικές περιοχές και το σύστημα διατροφής τους.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Andrews, E.D., Hart, L.I., Stephenson, B.J., 1960. Vitamin B12 and cobalt in livers from grazing cobalt-deficient lambs and from others given various cobalt supplements. New Zeal J Agr Res 3, 364- 376.

Anthony, W.B., Couch, J.R., Rupel, I.W., Henderson, M.B., Brown, C., 1951. Vitamin B12 in blood of newborn and colostrum-fed calves and in colostrum and normal milk of Holstein and Jersey cows. J Dairy Sci 34, 749-753.

Bland, J.M., Altman, D.G., 1986. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. Lancet 1, 307-310.

Bowen, R.A., Drake, S.K., Vanjani, R., Huey, E.D., Grafman, J., Horne, M.K., 3rd, 2006. Markedly increased vitamin B12 concentrations attributable to IgG-IgM-vitamin B12 immune complexes. Clin Chem 52, 2107-2114.

Brun-Hansen, H.C., Kampen, A.H., Lund, A., 2006. Hematologic values in calves during the first 6 months of life. Vet Clin Pathol 35, 182-187.

Duplessis, M., Mann, S., Nydam, D.V., Girard, C.L., Pellerin, D., Overton, T.R., 2015. Short communication: Folates and vitamin B12 in colostrum and milk from dairy cows fed different energy levels during the dry period. J Dairy Sci 98, 5454-5459.

Federici, L., Henoun Loukili, N., Zimmer, J., Affenberger, S., Maloisel, F., Andres, E., 2007. [Update of clinical findings in cobalamin deficiency: personal data and review of the literature]. Rev Med Interne 28, 225-231.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Fisher, G.E., 1991. Effect of cobalt deficiency in the pregnant ewe on reproductive performance and lamb viability. Res Vet Sci 50, 319-327.

Girard, C.L., Matte, J.J., 2005. Effects of intramuscular injections of vitamin B12 on lactation performance of dairy cows fed dietary supplements of folic acid and rumen-protected methionine. J Dairy Sci 88, 671-676.

Girard, C.L., Santschi, D.E., Stabler, S.P., Allen, R.H., 2009. Apparent ruminal synthesis and intestinal disappearance of vitamin B12 and its analogs in dairy cows. J Dairy Sci 92, 4524-4529.

Grace, N.D., Knowles, S.O., Nortje, R., 2014. Vitamin B12 status and the effects of vitamin B12 supplementation during the first year of life of spring calves from pasture-fed dairy herds. N Z Vet J 62, 274-278.

Gruner, T.M., Sedcole, J.R., Furlong, J.M., Grace, N.D., Williams, S.D., Sinclair, G., Sykes, A.R., 2004. Changes in serum concentrations of methylmalonic acid and vitamin B12 in cobalt-supplemented ewes and their lambs on two cobalt-deficient properties. N Z Vet J 52, 117-128.

Haplin, C.G., Harris, D.J., Caple, I.W., Petterson, D.S., 1984. Contribution of cobalamin analogues to plasma vitamin B12 concentrations in cattle. Research in Veterinary Science 37, 249-251.

Idexx, L., 2008. IDEXX VetAutoread Hematology Analyzer Operator's Guide. https://www.idexx.com/files/vetautoread-operators-guide-en.pdf.

Kennedy, S., McConnell, S., Anderson, H., Kennedy, D.G., Young, P.B., Blanchflower, W.J., 1997. Histopathologic and ultrastructural alterations of white liver disease in sheep experimentally depleted of cobalt. Veterinary pathology 34, 575-584.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Knowles, S.O., Grace, N.D., 2017. The vitamin B12 and Se status of lambs during their transition from milk-fed monogastric to grazing herbivore. N Z Vet J 65, 113-118.

Koury, M.J., Ponka, P., 2004. New insights into erythropoiesis: the roles of folate, vitamin B12, and iron. Annu Rev Nutr 24, 105-131.

Martens, J.H., Barg, H., Warren, M.J., Jahn, D., 2002. Microbial production of vitamin B12. Appl Microbiol Biotechnol 58, 275-285.

Mburu, J.N., Kamau, J.M., Badamana, M.S., 1993. Changes in serum levels of vitamin B12, feed intake, liveweight and hematological parameters in cobalt deficient small east African goats. Int J Vitam Nutr Res 63, 135-139.

McDowell, L.R., 2000. Vitamin B12, In: Vitamins in Animal and Human Nutrition, 2nd Edition ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, pp. 523-563.

Mohri, M., Sharifi, K., Eidi, S., 2007. Hematology and serum biochemistry of Holstein dairy calves: age related changes and comparison with blood composition in adults. Res Vet Sci 83, 30-39.

Panousis, N., Siachos, N., Kitkas, G., Kalaitzakis, E., Kritsepi-Konstantinou, M., Valergakis, G.E., 2019. Corrigendum to "Hematology reference intervals for neonatal Holstein calves" [Research in Veterinary Science, 118 (2018), 1-10]. Res Vet Sci 123, 184.

Radostits, O.M., Bell, J.M., 1970. Nutrition of the pre ruminant dairy calf with special reference to the digestion and absorption of nutrients: A review. Can J Anim Sci 50, 405- 452.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Reece, W.O., Hotchkiss, D.K., 1987. Blood studies and performance among calves reared by different methods. J Dairy Sci 70, 1601-1611.

Resources., N.R.C.C.o.A.N.B.o.A.a.N., 2001. Vitamins, In: Nutrient Requirements of Dairy Cattle, Seventh ed, pp. 162-177.

Scheidegger, H.R., 1973. [Behavior of fetal hemoglobin in Simmental calfs]. Schweiz Arch Tierheilkd 115, 499-506.

Smit, J.J., Schonewille, J.T., Beynen, A.C., 1999. Transient lowering of plasma vitamin B12 concentrations in Ouessant sheep fed on a potassium-rich ration. Int J Vitam Nutr Res 69, 273-276.

Stangl, G.I., Schwarz, F.J., Muller, H., Kirchgessner, M., 2000. Evaluation of the cobalt requirement of beef cattle based on vitamin B12, folate, homocysteine and methylmalonic acid. The British journal of nutrition 84, 645-653.

Steinhardt, M., Gollnast, I., Langanke, M., Bunger, U., Kutschke, J., 1993. [Clinico-chemical blood values in newborn calves. 1. Effects of some internal and external conditions]. Tierarztl Prax 21, 295-301.

Suttle, N.F., Jones, D.G., 1989. Recent developments in trace element metabolism and function: trace elements, disease resistance and immune responsiveness in ruminants. J Nutr 119, 1055-1061.

Sutton, A.L., Elliot, J.M., 1972. Effect of ratio of roughage to concentrate and level of feed intake on ovine ruminal vitamin B 12 production. J Nutr 102, 1341-1346.

Tiffany, M.E., Fellner, V., Spears, J.W., 2006. Influence of cobalt concentration on vitamin B12 production and fermentation of mixed

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

ruminal microorganisms grown in continuous culture flow-through fermentors. J Anim Sci 84, 635-640.

Vellema, P., Rutten, V.P., Hoek, A., Moll, L., Wentink, G.H., 1996. The effect of cobalt supplementation on the immune response in vitamin B12 deficient Texel lambs. Veterinary immunology and immunopathology 55, 151-161.

Walker, C.K., Elliot, J.M., 1972. Lactational trends in vitamin B 12 status on conventional and restricted-roughage rations. J Dairy Sci 55, 474-479.

Wood, D., Quiroz-Rocha, G.F., 2010. Normal Hematology of Cattle, In: Schalm's Veterinary Hematology, 6th ed. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA, pp. 829-835.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ

ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΑΡΙΘΜΟΥ ΤΩΝ ΛΕΥΚΩΝ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΕΠΙΧΡΙΣΜΑΤΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΜΕ ΤΟΝ ΑΥΤΟΜΑΤΟ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΑΝΑΛΥΤΗ ADVIA 120 (SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS, DEERFIELD, IL, USA)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ένας ακόμα παράγοντας που επηρεάζει τα αποτελέσματα των αιματολογικών παραμέτρων των ζώων είναι η τεχνική που θα χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση του αίματος.

1.1. Αυτόματοι αιματολογικοί αναλυτές

Η γενική εξέταση του αίματος, όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως, είναι μείζονος σημασίας για τη διάγνωση και την παρακολούθηση νοσημάτων. Αποτελεί μία από τις πιο συχνά διενεργούμενες εξετάσεις που γίνονται σε καθημερινή βάση, με το κόστος της να είναι συνήθως περιορισμένο και να διεξάγονται σε αυτόματους αιματολογικούς αναλυτές σε μεγάλες κλινικές-νοσοκομεία ή σε μικρά εργαστήρια (Welles, 2015). Η τεχνολογική πρόοδος και η εξέλιξη των αιματολογικών αναλυτών με ειδικές ρυθμίσεις για χρήση στα ζώα συνετέλεσε στη μαζικότερη διενέργεια αιματολογικών εξετάσεων, λόγω της ταχύτητας και της ευκολίας της ανάλυσης. Ωστόσο, οι απλοί κτηνιατρικοί αιματολογικοί αναλυτές έχουν ρυθμίσεις κυρίως για τα ζώα συντροφιάς και από τα μηρυκαστικά συνήθως για τα βοοειδή. Έτσι, ρυθμίσεις για τα πρόβατα και τις αίγες διαθέτουν μόνο ιδιαίτερα δαπανηροί κτηνιατρικοί

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

αναλυτές που προορίζονται για μεγάλα νοσοκομεία ζώων ή εξειδικευμένα εργαστήρια και το κόστος τους ξεπερνά τις οικονομικές δυνατότητες κτηνιατρείων και μικρών κλινικών.

Υπάρχουν διάφοροι τύποι αυτόματων αιματολογικών αναλυτών διαφορετικής τεχνολογίας, όπως η ηλεκτρική αντίσταση, η κυτταρομετρία ροής και η κυτταρομετρία ροής φθορισμού, σε συνδυασμό με χημικά αντιδραστήρια που λύουν ή μεταβάλλουν τα κύτταρα του αίματος ώστε να διευρύνεται το σύνολο των μετρήσιμων παραμέτρων.

Με την κυτταρομετρία ροής με φθορισμό, τα κύτταρα διέρχονται από ένα σταθερό σημείο όπου προσπίπτει μία φωτεινή ακτίνα, π.χ. laser. Με αυτή τη μέθοδο προσδιορίζεται ο σκεδασμός του φωτός από το κύτταρο υπό διάφορες γωνίες, ο πρόσθιος σκεδασμός μετράει τον όγκο του κυττάρου, ενώ ο πλάγιος, την πυκνότητα του κυτταροπλάσματος και την εσωτερική πολυπλοκότητά του. Επιπλέον, χρησιμοποιούνται φθορίζοντα αντιδραστήρια, επεκτείνοντας τον προσδιορισμό ειδικών κυτταρικών πληθυσμών. Οι φθορίζουσες χρωστικές αποκαλύπτουν το λόγο πυρήνα-πλάσματος για κάθε κύτταρο και στοιχεία για την επιφάνεια του κυττάρου και τα αντιγόνα του κυτταροπλάσματος. Έτσι, γίνεται λεπτομερής ανάλυση πολύπλοκων κυτταρικών πληθυσμών σε μικρό χρονικό διάστημα (Brown and Wittwer, 2000). Η μέθοδος αυτή είναι χρήσιμη για την ανάλυση των αιμοπεταλίων, των εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων και των δικτυοερυθροκυττάρων, καθώς και τον προσδιορισμό όλων των επιμέρους λευκών αιμοσφαιρίων.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Ο προσδιορισμός των δικτυοερυθροκυττάρων με την κυτταρομετρία ροής βασίζεται στην ταυτοποίηση υπολειμματικών ριβοσωμάτων και RNA στα ανώριμα και χωρίς πυρήνα, ερυθρά αιμοσφαίρια του αίματος. Όσον αφορά τα λευκά αιμοσφαίρια, η κυτταρομετρία ροής είναι πολύ αποτελεσματική στη διάκριση μυελοειδών και λεμφοειδών σειρών σε οξείες λευχαιμίες και ελάχιστα διαφοροποιημένες λευχαιμίες. (Brown and Wittwer, 2000).

Οι κατασκευαστές συνδυάζουν αυτές τις τεχνολογίες με καινοτόμες χρήσεις αντιδραστηρίων και εργαλείων ανάλυσης δεδομένων για την παραγωγή μεθόδων, με διαφορετικά πλεονεκτήματα η κάθε μία, όσον αφορά την ακρίβεια, την ταχύτητα ή το εύρος των παραμέτρων. Ανάλογα τον συνδυασμό των παραπάνω, μπορεί ένας αναλυτής να είναι πιο ακριβής στην μέτρηση της αιμοσφαιρίνης, κάποιος άλλος να διενεργεί έναν εσωτερικό έλεγχο ποιότητας ή άλλος να χρησιμοποιεί περισσότερες γωνίες σκέδασης του φωτός και να έχει ακριβέστερη αναγνώριση των επιμέρους λευκών αιμοσφαιρίων και των μορφολογικών ανωμαλιών των κυττάρων (Bruegel et al., 2015; Hotton et al., 2013).

Συνοψίζοντας τα πλεονεκτήματα της χρήσης των αυτόματων αιματολογικών αναλυτών είναι η ταχύτητα και η ευκολία διεξαγωγή της γενικής εξέτασης του αίματος, ενώ στα κύρια μειονεκτήματά της αναφέρεται η αναγνώριση μορφολογικών ανωμαλιών των κυττάρων (Gulati et al., 2013), αν και οι σύγχρονοι αναλυτές φαίνονται ολοένα και περισσότερο αξιόπιστοι στην ανίχνευση μορφολογικών ανωμαλιών ερυθρών αιμοσφαιρίων (Kjelgaard-Hansen and Jensen, 2010) Επιπλέον, το κόστος αγοράς αναλυτή

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

τεχνολογίας αιχμής περιορίζει τη χρήση του σε εξειδικευμένα εργαστήρια και νοσοκομεία ζώων.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, συχνά διαπιστώνονται σφάλματα στον προσδιορισμό των αιμοπεταλίων από αιματολογικούς αναλυτές λόγω της παρουσίας συσσωματωμάτων (Kjelgaard-Hansen and Jensen, 2010). Επιπλέον, η παρουσία γιγαντοαιμοπεταλίων, χαρακτηριστικό αναγεννητικότητάς τους, λόγω του παρόμοιου μεγέθους με αυτό των ερυθρών αιμοσφαιρίων, οδηγεί συχνά σε ταυτόχρονα εσφαλμένο προσδιορισμό του αριθμού των αιμοπεταλίων, που φαίνεται μειωμένος και των ερυθρών αιμοσφαιρίων, που φαίνεται ψευδώς αυξημένος (Allison and Meinkoth, 2007).

1.2. Επίχρισμα αίματος ως μέθοδος ανάλυσής του

Η μικροσκοπική εξέταση του αίματος αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της γενικής εξέτασης του αίματος. Είναι απαραίτητη για τον έλεγχο της μορφολογίας των κυττάρων του αίματος, όπως η παρουσία εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων, άωρων ουδετεροφίλων, τοξικών ουδετεροφίλων και λεμφοκυττάρων και άλλων μορφολογικών ανωμαλιών καθώς και για την συνεκτίμηση των αποτελεσμάτων της γενικής εξέτασης του αίματος από τους αυτόματους αιματολογικούς αναλυτές (Welles, 2015).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Σε κάθε περίπτωση παθολογικών ευρημάτων στη γενική εξέταση του αίματος που προσδιορίζεται με τον αιματολογικό αναλυτή, συστήνεται η επιβεβαίωση στο επίχρισμα του αίματος. Η επιβεβαίωση αυτή κρίνεται απαραίτητη για το λευκοκυτταρικό τύπο, ιδιαίτερα όταν πρόκειται για παλαιότερης τεχνολογίας αιματολογικούς αναλυτές (Gulati et al., 2013).

Βασικό μειονέκτημα της μικροσκοπικής εξέτασης του αίματος σε σχέση με τους αυτόματους αναλυτές είναι η αδυναμία ποσοτικού προσδιορισμού των κυττάρων με ακρίβεια, αν και αναφέρεται ότι ένας έμπειρος εξεταστής όμως, μπορεί να εκτιμήσει αν υπάρχει αξιοσημείωτη λευκοκυττάρωση ή λευκοπενία (Kjelgaard-Hansen and Jensen, 2010). Το κυριότερο μειονέκτημα είναι η υποκειμενικότητα της μικροσκοπικής παρατήρησης αλλά και η χρονοβόρα διαδικασία που απαιτείται για την ολοκλήρωση της εξέτασης.

Για τον προσδιορισμό του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων στο επίχρισμα του αίματος προτείνεται καταμέτρηση ανά πεδίο και πολλαπλασιασμός με ειδικό συντελεστή. Ο συντελεστής αυτός ποικίλει ανάλογα τη μεγέθυνση που χρησιμοποιείται, 100 με 150, όταν χρησιμοποιείται μεγέθυνση 100Χ (10Χ οφθαλμικός και 10Χ αντικειμενικός φακός) και 400 με 600 για μεγέθυνση 200Χ (10Χ οφθαλμικός και 20Χ αντικειμενικός φακός). Λόγω της μεγάλης ποικιλίας, συστήνεται ο προσδιορισμός του συντελεστή διόρθωσης σε έναν αριθμό επιχρισμάτων αίματος στα οποία έχει προσδιοριστεί με ακρίβεια ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων (Harvey, 2001). Για το σκύλο , ο μέσος όρος των λευκών αιμοσφαιρίων που μετριούνται σε 20 πεδία (με 10Χ ή 40Χ αντικειμενικό φακό) πολλαπλασιάζεται με 1500 (Petanides et al., 2004). Επιπλέον, διαφορές στον αριθμό των κυττάρων του αίματος που

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

παρατηρούνται ανά οπτικό πεδίο, μπορεί να οφείλονται στο γεγονός ότι διαφορετικά είδη ζώων έχουν και διαφορετικό μέγεθος κυττάρων (Byers and Kramer, 2010; Rizzi et al., 2010). Ακόμα, η ποιότητα του επιχρίσματος επηρεάζει τον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων, καθώς μεγάλος αριθμός τους μπορεί να συγκεντρωθεί στο τέλος του επιχρίσματος. Όσον αφορά τα αιμοπετάλια, υπάρχουν δυο συντελεστές διόρθωσης, 15.000 και 20.000, που έχουν προταθεί για τα επιχρίσματα το ανθρώπου (Gulati et al., 2013) και των ζώων (Allison and Meinkoth, 2007; Severine et al., 1999; Weiss, 1984).

2. **ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ**

Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν α) να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων που προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της μικροσκοπικής εξέτασης του επιχρίσματος του αίματος και αυτών που προσδιορίστηκαν με τον αυτόματο αιματολογικό αναλυτή και να προσδιοριστεί ένας κατάλληλος συντελεστής διόρθωσης για τη μέθοδο της μικροσκοπικής εξέτασης και β) συγκριτική αξιολόγηση δύο προτεινόμενων συντελεστών για τον υπολογισμό του αριθμού των αιμοπεταλίων στο επίχρισμα του αίματος προβάτων.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

3. ΜΕΘΟΔΟΙ- ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Πριν από την έναρξη της μελέτης, υπολογίστηκε το ελάχιστο μέγεθος δείγματος που απαιτείται χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της μονομερούς ανάλυσης σε επαναλαμβανόμενες μετρήσεις με τη διαδικασία διόρθωσης Geisser-Greenhouse χρησιμοποιώντας το λογισμικό GLIMMPSE (http://glimmpse.samplesizeshop.org/) (Kreidler et al., 2013). Η επιθυμητή ισχύς ορίστηκε στο 0,8, το ποσοστό σφάλματος τύπου I στο 0,05 και η επιθυμητή ανιχνεύσιμη διαφορά ορίστηκε στο 10% με τυπική απόκλιση 10% (Kjelgaard-Hansen and Jensen, 2010). Ο συντελεστής κλίμακας των μέσων ορίστηκε στο 1 και ο συντελεστής κλίμακας της μεταβλητότητας ρυθμίστηκε στο 2. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν ότι το ελάχιστο μέγεθος δείγματος που απαιτείται είναι 31 ζώα (P = 0,81).

Ολικό αίμα συλλέχθηκε από 88 υγιή θηλυκά πρόβατα, ηλικίας 2- 5 ετών, της φυλής Χίου. Το αίμα συλλέχθηκε από τη σφαγίτιδα φλέβα απευθείας σε φιαλίδια με αντιπηκτικό EDTA (Venoject, Terumo Europe, Leuven, Belgium). Άμεσα έγινε ήπια ανάμειξη για να αποφευχθεί η πήξη του αίματος, όπως άλλωστε και πριν από οποιαδήποτε εξέταση.

Τα δείγματα μεταφέρθηκαν άμεσα στο Διαγνωστικό Εργαστήριο του Τμήματος Κτηνιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, τα οποία είχαν τοποθετηθεί σε φορητό δοχείο ψύξης μαζί με παγοκύστες, οι οποίες όμως δεν έρχονταν σε άμεση επαφή με τα φιαλίδια. Οι

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

αιματολογικές εξετάσεις πραγματοποιήθηκαν μέσα σε 2 ώρες από τη στιγμή της συλλογής των δειγμάτων. Η ανάλυση των δειγμάτων έγινε με τη χρήση του αυτόματου αιματολογικού αναλυτή ADVIA 120 (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA). Η παρασκευή των επιχρισμάτων του αίματος έγινε άμεσα. Αφού μονιμοποιήθηκαν, βάφτηκαν με τη χρώση Giemsa.

Στην περιοχή του επιχρίσματος, όπου τα κύτταρα είναι τοποθετημένα σε μονή στοιβάδα, υπολογίστηκε ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων σε 20 πεδία με μεγέθυνση 400Χ (10Χ οφθαλμικός και 40Χ αντικειμενικός φακός) και υπολογίστηκε ο μέσος όρος λευκών αιμοσφαιρίων ανά οπτικό πεδίο. Αυτό έγινε και στα 88 επιχρίσματα αίματος. Από τα 88 επιχρίσματα, τα 57 χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του συντελεστή διόρθωσης και τα άλλα 31 για την αξιολόγησή του.

Στα 57 επιχρίσματα που χρησιμοποιήθηκαν προηγουμένως, έγινε έλεγχος για την παρουσία συσσωματωμάτων αιμοπεταλίων στο τέλος του επιχρίσματος όπου σχηματίζεται το λεγόμενο «φτερό» του επιχρίσματος. Σε 4 δείγματα, παρατηρήθηκαν συσσωματώματα αιμοπεταλίων και αποκλείστηκαν από τη μελέτη. Στα υπόλοιπα 53 δείγματα, υπολογίστηκε ο συνολικός αριθμός των αιμοπεταλίων που παρατηρήθηκαν σε 5 πεδία με μεγέθυνση 1000Χ (10Χ οφθαλμικός και 100Χ αντικειμενικός φακός). Ο αριθμός αυτός διαιρέθηκε με τον αριθμό 5 και πολλαπλασιάστηκε με τους συντελεστές 15,000 και 20,000 όπως έχει προταθεί σε προηγούμενες μελέτες (Allison and Meinkoth, 2007; Severine et al., 1999; Weiss, 1984).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Πραγματοποιήθηκε ανάλυση παλινδρόμησης ώστε να μπορέσει να δημιουργηθεί η εξίσωση όπου στον άξονα y είναι ο αριθμός των WBCs που υπολογίστηκε με τον αυτόματο αναλυτή ADVIA (WBC1_ADVIA) και στον άξονα x είναι ο μέσος όρος του αριθμού των WBCs ανά οπτικό πεδίο που υπολογίστηκε στο επίχρισμα αίματος (WBC_PF). Η αξιολόγηση της συμφωνίας μεταξύ των δύο μεθόδων πραγματοποιήθηκε με την ανάλυση παλινδρόμησης Passing- Bablok (Passing and Bablok, 1983; Passing and Bablok, 1984) και τη μέθοδο Bland-Altman. Για την επαλήθευση της εξίσωσης χρησιμοποιήθηκαν 31 δείγματα και η μέθοδος Bland-Altman για την αξιολόγηση της συμφωνίας των τιμών του υπολογίστηκαν από το επίχρισμα αίματος και του αυτόματου αναλυτή ADVIA.

Ομοίως, έγινε αξιολόγηση με τη μέθοδο Bland-Altman της συμφωνίας μεταξύ του αριθμού των αιμοπεταλίων που υπολογίστηκαν με τη μέθοδο του επιχρίσματος χρησιμοποιώντας διαφορετικούς συντελεστές διόρθωσης και του αριθμού που υπολογίστηκε από τον αιματολογικό αναλυτή ADVIA. Η ακρίβεια και η αξιοπιστία των μετρήσεων ελέγχθηκε με τον συντελεστή συσχετισμού αντιστοίχησης. Για την ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό MedCalc®9.2 (Mariakerke, Belgium).

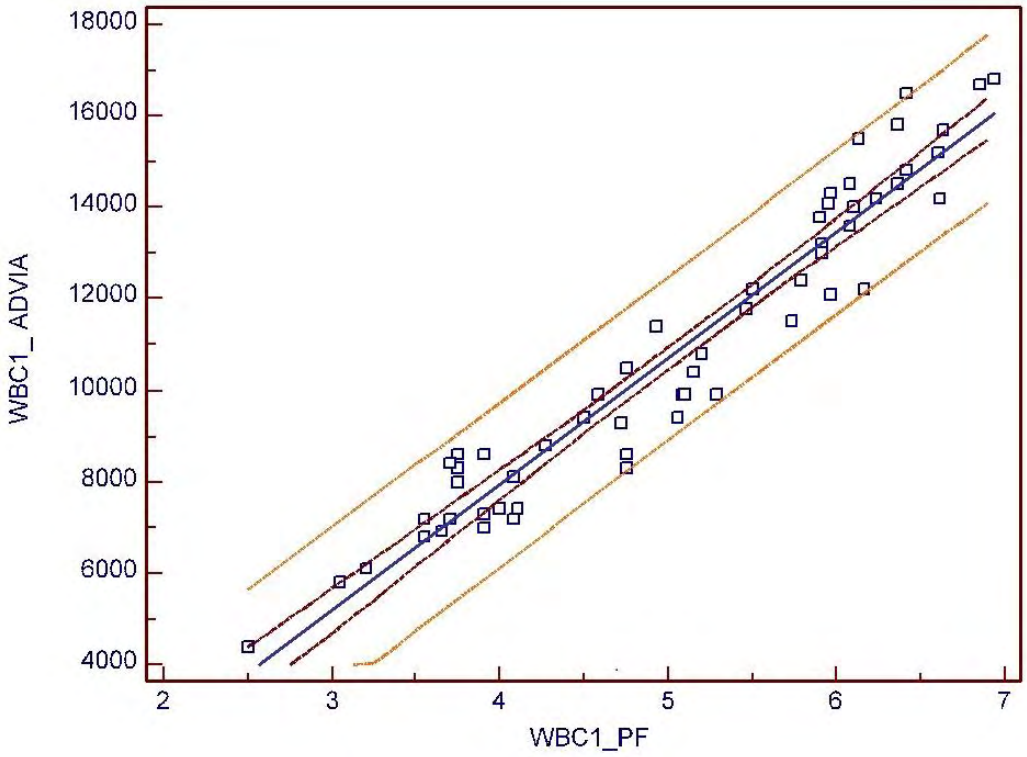
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η εξίσωση που προκύπτει από τη γραμμική ανάλυση είναι η ακόλουθη:

y =-3094,86 + 2761,41x (**Εξίσωση 1**),

όπου y= WBC1_ADVIA και x= WBC1_PF και ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2) ήταν 0,9281 (P<0,001). Η γραμμική συσχέτιση φαίνεται στο **Γράφημα 1**.



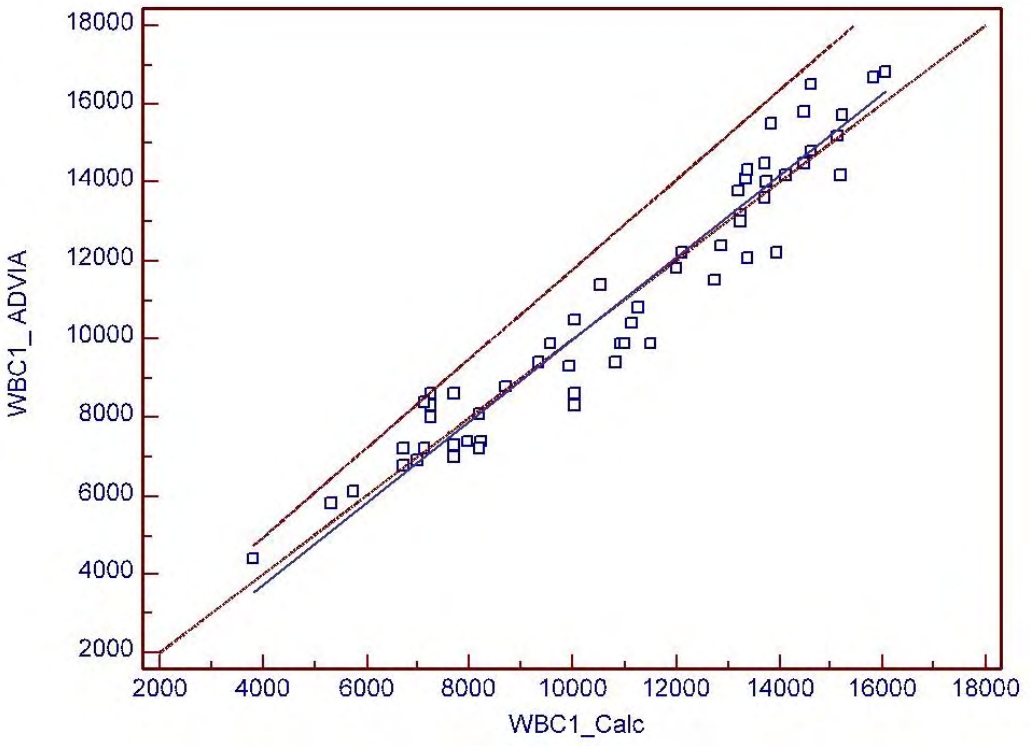
Γράφημα 1. ***Γ****ραφική παράσταση γραμμικής παλινδρόμησης μεταξύ του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων που υπολογίστηκαν από τον αναλυτή ADVIA (WBC1_ADVIA) και του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων ανά οπτικό πεδίο που υπολογίστηκαν με τον αντικειμενικό φακό 40Χ στο επίχρισμα του αίματος*

Η ανάλυση Passing-Bablok οδήγησε στη δημιουργία της ακόλουθης εξίσωσης

y=-438,47 (95%CI: -1563,35 μέχρι 398,77) + 1,05 x (95%CI: 0,97 μέχρι 1,14),

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

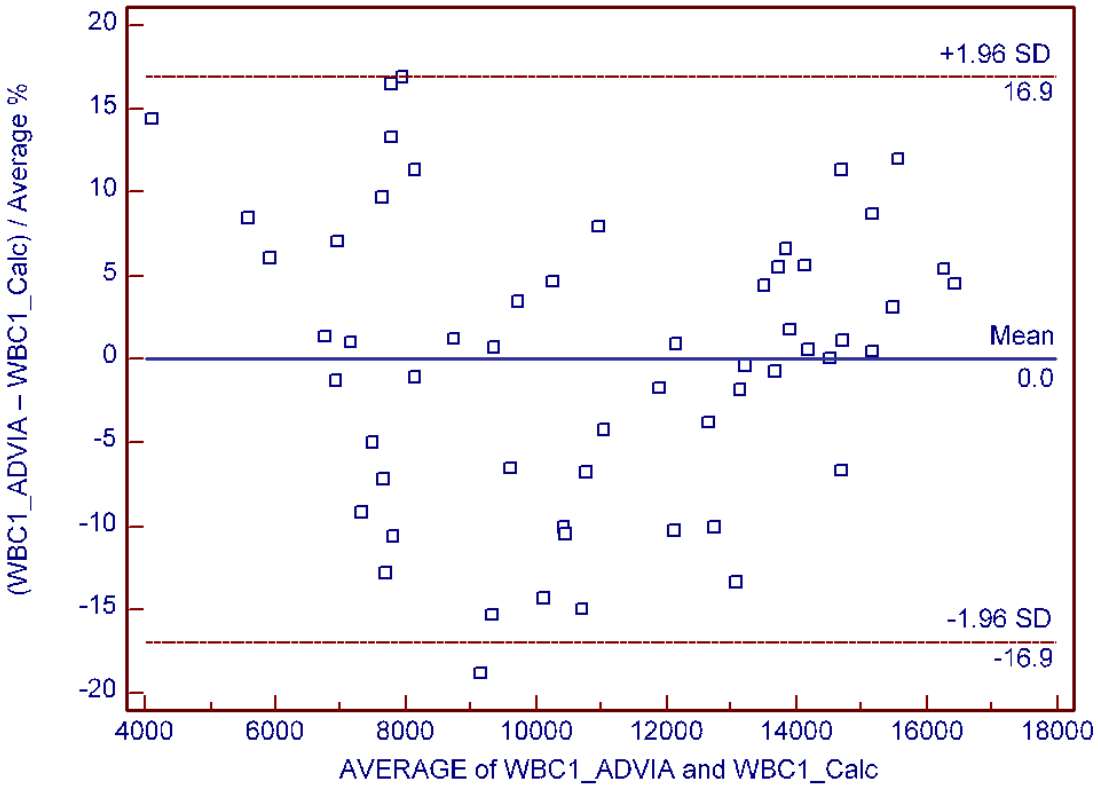
ανάμεσα στον αριθμό των WBCs που υπολογίστηκε με τον αυτόματο αιματολογικό αναλυτή ADVIA και στον αριθμό των WBCs που υπολογίστηκε με τη μέθοδο της μικροσκοπικής εξέτασης του επιχρίσματος χρησιμοποιώντας την **Εξίσωση 1** από τη γραμμική ανάλυση. Το διάγραμμα διασποράς παρουσιάζεται στο **Γράφημα 2**.



Γράφημα 2. *Γραφική παράσταση παλινδρόμησης κατά την ανάλυση Passing and Bablok μεταξύ του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων που υπολογίστηκαν από τον αναλυτή ADVIA (WBC1_ADVIA) και τον υπολογισμένο αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων (WBC1_Calc) βάσει της εξίσωσης της γραμμικής παλινδρόμησης*

Η διασπορά των μετρήσεων με τη μέθοδο Bland–Altman παρουσιάζονται στο **Γράφημα 3**. Η αξιοπιστία ανάμεσα στις δύο μεθόδους μέτρησης του αριθμού των WBCs είναι 96,34 % (r = 0,96) και η ακρίβεια 99,93%.

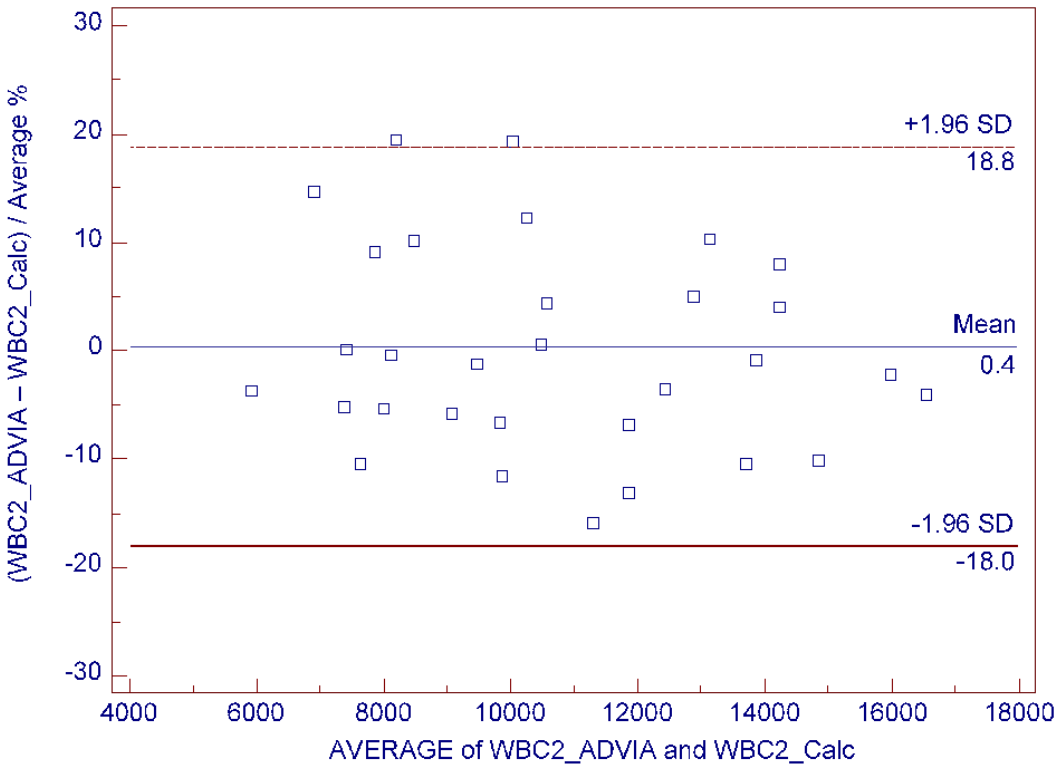
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248



Γράφημα 3. *Γραφική παράσταση με τη μέθοδο Bland–Altman όπου παρουσιάζεται η διαφορά μεταξύ του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων που υπολογίστηκαν από τον αναλυτή ADVIA (WBC1_ADVIA) σε σχέση με τον υπολογισμένο αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων (WBC1_Calc) βάσει της εξίσωσης γραμμικής παλινδρόμησης*

Όσον αφορά την επιβεβαίωση της εξίσωσης της παλινδρόμησης, όπου χρησιμοποιήθηκαν 31 νέα δείγματα, η διασπορά των μετρήσεων με τη μέθοδο Bland–Altman παρουσιάζεται στο **Γράφημα 4**. Η αξιοπιστία ανάμεσα στον αριθμό των WBCs που προσδιορίστηκε με τον αιματολογικό αναλυτή ADVIA (WBC2_ADVIA) και του αριθμού των WBCs που υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τη γραμμική εξίσωση παλινδρόμησης (WBC2_Calc) ήταν 94,92% (r= 0,9472), η ακρίβεια ήταν 99,79% και το μέσο στατιστικό σφάλμα ήταν 0.4.

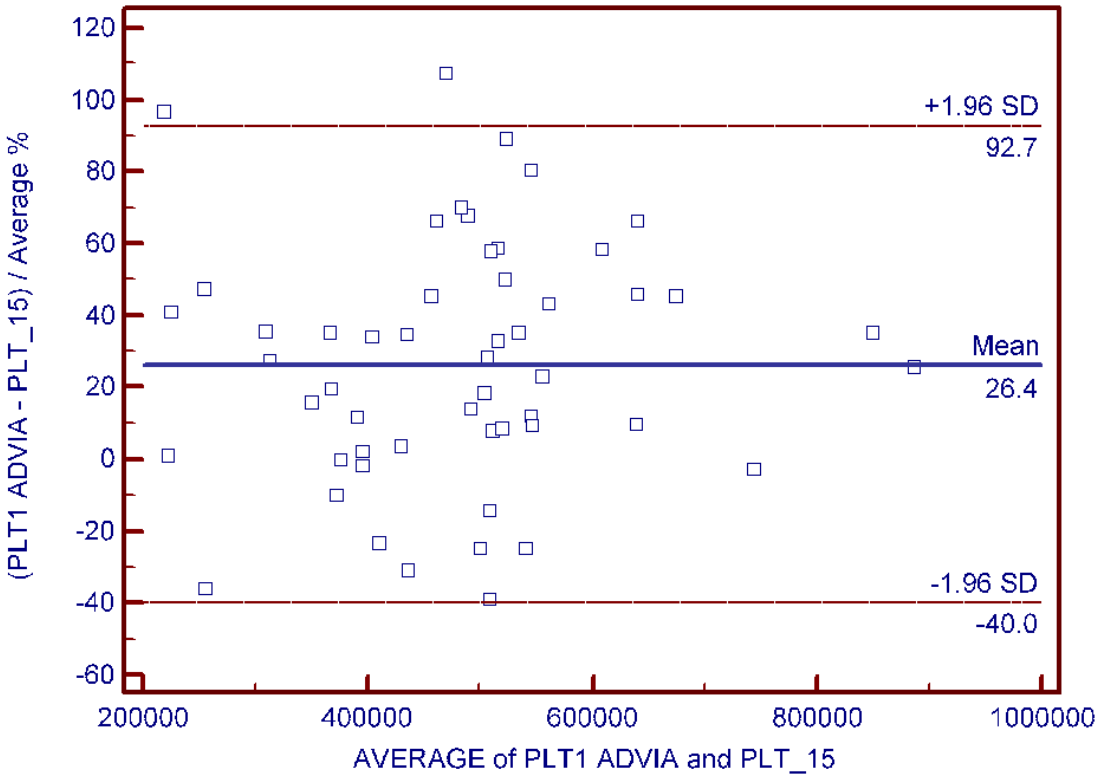
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248



Γράφημα 4. *Γραφική παράσταση κατά τη μέθοδο Bland-Altman όπου παρουσιάζεται η διαφορά μεταξύ του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων που υπολογίστηκε από τον αναλυτή ADVIA (WBC2_ADVIA) σε 31 νέα δείγματα σε σχέση με τον υπολογισμένο αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων (WBC2_Calc) με βάση την γραμμικής εξίσωση παλινδρόμησης στα ίδια 31 δείγματα*

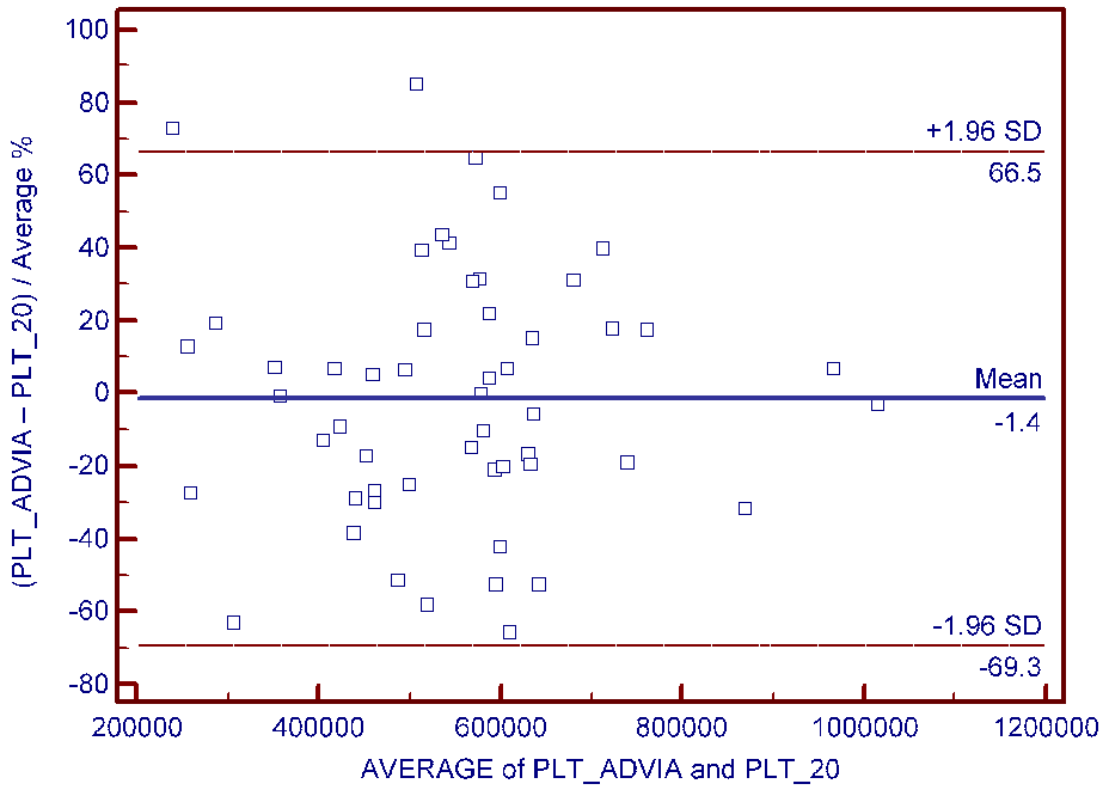
Η διασπορά των μετρήσεων με τη μέθοδο Bland–Altman ανάμεσα στον αριθμό των αιμοπεταλίων που προσδιορίστηκαν με τον αναλυτή ADVIA και του αριθμού των αιμοπεταλίων που υπολογίστηκαν με τη μέθοδο της μικροσκοπικής εξέτασης του επιχρίσματος, όπου χρησιμοποιήθηκαν οι συντελεστές διόρθωσης 15.000 (PLT_15) και 20.000 (PLT_20), φαίνονται στα **Γραφήματα 5** και **6**, αντίστοιχα.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248



Γράφημα 5. *Γραφική παράσταση κατά τη μέθοδο Bland-Altman που δείχνει τη διαφορά μεταξύ του αριθμού των αιμοπεταλίων που υπολογίστηκε από τον αναλυτή ADVIA (PLT_ADVIA) και του αριθμού των αιμοπεταλίων που υπολογίστηκε με μέτρηση των αιμοπεταλίων στο επίχρισμα του αίματος πολλαπλασιασμένη με τον παράγοντα 1 (PLT_15)*

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248



Γράφημα 6. *Γραφική παράσταση κατά τη μέθοδο Bland-Altman που δείχνει τη διαφορά μεταξύ του αριθμού των αιμοπεταλίων που υπολογίστηκε από τον αναλυτή ADVIA (PLT_ADVIA) και του αριθμού των αιμοπεταλίων που υπολογίστηκε με μέτρηση των αιμοπεταλίων στο επίχρισμα του αίματος πολλαπλασιασμένη με τον παράγοντα 2 (PLT_20)*

Η αξιοπιστία μεταξύ των δύο μεθόδων, όπου τα αιμοπετάλια πολλαπλασιάστηκαν με τον παράγοντα 1 (15.000) ήταν 49,26% (r = 0,356) και με τον παράγοντα 2 (20.000) ήταν 49,22% (r = 0,492). Η ακρίβεια των μεθόδων ήταν 72,2% και 99,91%, αντίστοιχα.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Παρά την μεγάλη πρόοδο στους αυτόματους αιματολογικούς αναλυτές, η αξιολόγηση του επιχρίσματος του αίματος παραμένει ένα πολύ σημαντικό διαγνωστικό εργαλείο.

Στη μελέτη αυτή υπήρξε αρκετά ισχυρή συσχέτιση ανάμεσα στη μέθοδο της μικροσκοπικής εξέτασης του επιχρίσματος και της αυτοματοποιημένης μεθόδου, όπως είχε περιγραφεί και προηγουμένως από άλλους μελετητές, σε ανθρώπινα δείγματα αίματος (Gulati et al., 2013).

Η εξίσωση παλινδρόμησης που δημιουργήθηκε (**Εξίσωση 1**) επιβεβαιώθηκε όχι μόνο με τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία της εξίσωσης αλλά και με 31 νέα δείγματα. Και στις δύο περιπτώσεις η εξίσωση αποδείχθηκε αξιόπιστη για τον υπολογισμό του αριθμού των WBCs με αυτόματο αιματολογικό αναλυτή βασιζόμενος στα αποτελέσματα της μικροσκοπικής εξέτασης του επιχρίσματος του αίματος.

Η μελέτη συμφωνεί με προηγούμενες αναφορές στην ανθρώπινη αιματολογία, δείχνοντας ότι δεν υπήρχε σημαντική διαφορά μεταξύ του αριθμού των αιμοπεταλίων που εκτιμήθηκε μικροσκοπικά σε επίχρισμα αίματος (χρησιμοποιώντας τον παράγοντα πολλαπλασιασμού των 20.000) και αυτού που προσδιορίστηκε με αυτοματοποιημένους αιματολογικούς αναλυτές. Το εύρημα αυτό είναι σύμφωνο με μια προηγούμενη μελέτη σε δείγματα γατών (Severine et al., 1999) ενώ στους σκύλους έχει προταθεί η χρήση συντελεστή πολλαπλασιασμού μεταξύ 15.000 και 18.000 (Weiss, 1984).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά, η μικροσκοπική εξέταση του επιχρίσματος του αίματος είναι μια αξιόπιστη και οικονομική μέθοδος και εκτός από τη σημασία της στον ποιοτικό έλεγχο των αιματολογικών εξετάσεων, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό του αριθμού των WBCs σε δείγματα προβάτων, ειδικά σε κτηνιατρικά εργαστήρια τα οποία έχουν περιορισμένους πόρους, με τη χρήση της **Εξίσωσης 1** που δημιουργήθηκε. Επιπλέον, αυτή η μελέτη έδειξε ότι η χρήση του συντελεστή πολλαπλασιασμού 20.000 όταν χρησιμοποιείται 100Χ αντικειμενικό φακό για τον υπολογισμό του αριθμού των αιμοπεταλίων στο επίχρισμα του αίματος προβάτων, δίνει αξιόπιστα και συγκρίσιμα αποτελέσματα με τον αιματολογικό αναλυτή.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Allison, R.W., Meinkoth, J.H., 2007. Hematology without the numbers: in-clinic blood film evaluation. Vet Clin North Am Small Anim Pract 37, 245-266, vi.

Brown, M., Wittwer, C., 2000. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. Clin Chem 46, 1221-1229.

Bruegel, M., Nagel, D., Funk, M., Fuhrmann, P., Zander, J., Teupser, D., 2015. Comparison of five automated hematology analyzers in a university hospital setting: Abbott Cell-Dyn Sapphire, Beckman Coulter DxH 800, Siemens Advia 2120i, Sysmex XE-5000, and Sysmex XN-2000. Clin Chem Lab Med 53, 1057-1071.

Byers, S.R., Kramer, J.W., 2010. Normal Hematology of Sheep and Goats, In: Weiss, D.J., Wardrop, K.J. (Eds.) Schalm's Veterinary Hematology. Blackwell Publishing, Ames, IA, USA, pp. 836-842.

Gulati, G., Song, J., Florea, A.D., Gong, J., 2013. Purpose and criteria for blood smear scan, blood smear examination, and blood smear review. Ann Lab Med 33, 1-7.

Harvey, J., 2001. Leukocyte Evaluation, In: Harvey, J. (Ed.) Atlas of veterinary hematology: blood and bone marrow of domestic animals W.O. Saunders Company, Philadelphia, pp. 24-26.

Hotton, J., Broothaers, J., Swaelens, C., Cantinieaux, B., 2013. Performance and abnormal cell flagging comparisons of three automated blood cell counters: Cell-Dyn Sapphire, DxH-800, and XN-2000. Am J Clin Pathol 140, 845-852.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Kjelgaard-Hansen, M., Jensen, A., 2010. Quality control In: Weiss, D.J., Wardrop, K.J. (Eds.) Schalm's Veterinary Hematology. Blackwell Publishing, Ames, IA, USA, pp. 1021-1175.

Kreidler, S.M., Muller, K.E., Grunwald, G.K., Ringham, B.M., Coker-Dukowitz, Z.T., Sakhadeo, U.R., Baron, A.E., Glueck, D.H., 2013. GLIMMPSE: Online Power Computation for Linear Models with and without a Baseline Covariate. J Stat Softw 54.

Passing, H., Bablok, 1983. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part I. J Clin Chem Clin Biochem 21, 709-720.

Passing, H., Bablok, W., 1984. Comparison of several regression procedures for method comparison studies and determination of sample sizes. Application of linear regression procedures for method comparison studies in Clinical Chemistry, Part II. J Clin Chem Clin Biochem 22, 431-445.

Petanides, T.A., Mylonakis, M.E., Koutinas, A.F., 2004. Evaluating the leukogram in the dog and cat. J Hellenic Vet Med Soc 55, 130-135

Rizzi, T.E., Meinkoth, J.H., Clinkenbeard, K.D., 2010. Normal Hematology of the Dog, In: Weiss, D.J., Wardrop, K.J. (Eds.) Schalm's Veterinary Hematology. Blackwell Publishing Ames, IA, USA, pp. 799-810.

Severine, T., Cripps, P.J., Mackin, A.J., 1999. Estimation of platelet counts on feline blood smears. Vet Clin Pathol 28, 42-45.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Weiss, D.J., 1984. Uniform evaluation and semiquantitative reporting of hematologic data in veterinary laboratories. Vet Clin Pathol 13, 27-31.

Welles, E.G., 2015. Automated in-clinic hematology instruments for small animal practitioners: what is available, what can they really do, and how do i make a choice? Vet Clin North Am Exot Anim Pract 18, 147-155.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV

ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΣΤΗ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΤΟΝ ΑΡΙΘΜΟ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΒΑΤΩΝ ΥΣΤΕΡΑ ΑΠΟ ΦΥΣΙΚΗ ΜΟΛΥΝΣΗ Η΄/ΚΑΙ ΕΚΘΕΣΗ ΣΤΟ *Anaplasma phagocytophilum*

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. *Anaplasma phagocytophilum*- Ταξινόμηση- Μετάδοση

Το A*naplasma phagocytophilum* είναι ενδοκυτταρικό, gram-αρνητικό βακτήριο, χωρίς κυτταρικό τοίχωμα. Ανήκει στο γένος Anaplasma και την οικογένεια Anaplasmataceae. Αρχικά η ονομασία του ήταν *Ehrlichia phagocytophilum*, στη συνέχεια άλλαξε σε *Ehrlichia equi* και τέλος πήρε τη σημερινή ονομασία του, A*naplasma phagocytophilum.* Το ίδιο βακτήριο αποτελεί και τον αιτιολογικό παράγοντα της κοκκιοκυτταρικής ερλιχίωσης του ανθρώπου. Στο ίδιο γένος ανήκουν και άλλα είδη που προσβάλουν τα διάφορα είδη ζώων, όπως είναι τα *A. marginale*, *A. centrale, A. ovis, A. bovis* και το *A. platys* (Dumler, 2005; Dumler et al., 2001).

Το *A. phagocytophilum* μεταδίδεται με τους κρότωνες των γενών *Haemophysalis, Dermacentor, Rhipicephalus* και *Ixodes* (Torina et al., 2010), σε πολλά είδη ξενιστών και είναι υπεύθυνο για την εμφάνιση νόσου τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα (Dumler et al., 2005). Για το λόγο αυτό, η εμφάνιση περιστατικών συμπίπτει συνήθως με την εποχή παρουσίας των κροτώνων και την έξοδο των ζώων για βόσκηση στα λιβάδια, οπότε και έρχονται σε επαφή με τους κρότωνες (Pusterla et al., 1998).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

1.2. Κλινική εικόνα

Στα μηρυκαστικά, το νόσημα που προκαλείται από το *A*. *phagocytophilum,* ονομάζεται κροτωνογενής πυρετός (Tick Borne Fever) λόγω του εξαιρετικά υψηλού πυρετού που εμφανίζουν τα ζώα, αν και δεν είναι το κύριο χαρακτηριστικό του νοσήματος (Scott, 2015). Επιπλέον, μπορεί να παρατηρηθεί κατάπτωση, συμπτώματα από το αναπνευστικό σύστημα, διάρροιες, όπως και αποβολές σε πρόβατα και αγελάδες (Gokce and Woldehiwet, 1999b), που μπορεί να φτάσουν το 90% των έγκυων ζώων. Το ποσοστό αυτό είναι υψηλό, αν τα ζώα έρθουν για πρώτη φορά σε επαφή με το *A*. *phagocytophilum* κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης τους (Scott, 2015). Δεν αποκλείεται, όμως, και η απουσία των κλινικών συμπτωμάτων στα μηρυκαστικά καθώς και η εμφάνιση μόνο συμπτωμάτων από δευτερογενείς λοιμώξεις, ως αποτέλεσμα της ανοσοκαταστολής που αναφέρεται ότι προκαλεί το *A. phagocytophilum* (Gokce and Woldehiwet, 1999c; Larsen et al., 1994; Woldehiwet, 2008).

1.3. Αιματολογικές διαταραχές

Το A. *phagocytophilum*, όπως προαναφέρθηκε, είναι ενδοκυτταρικό βακτήριο και προσβάλει τα κύτταρα του αίματος. Αρχικά προσβάλλει τα κοκκιοκύτταρα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

του αίματος, δηλαδή τα ουδετερόφιλα κυρίως, τα εωσινόφιλα και σπάνια τα βασίφιλα. Στην οξεία φάση της λοίμωξης, μπορεί να προσβληθούν έως και το 90% των ουδετερόφιλων (Foggie, 1951), ενώ κατά την εξέλιξή της, προσβάλλονται και τα μονοκύτταρα και τα λεμφοκύτταρα.

Ύστερα από πειραματική μόλυνση, τα κυριότερα ευρήματα της αιματολογικής εξέτασης που έχουν αναφερθεί (Gokce and Woldehiwet, 1999a; Ogden et al., 1998) αφορούν στα λευκά αιμοσφαίρια και πιο συγκεκριμένα τα κοκκώδη κύτταρα και τα λεμφοκύτταρα (Batungbacal et al., 1982) και λιγότερο τα μονοκύτταρα. Αναφέρεται κυρίως λευκοπενία με ουδετεροπενία, λεμφοπενία και μονοκυττάρωση (Gokce and Woldehiwet, 1999a; Stuen et al., 2011). Επιπλέον, διαπιστώνεται θρομβοκυτταροπενία και αναιμία (Gokce and Woldehiwet, 1999a)

1.4. Διαγνωστικές μέθοδοι

1.4.1. Μέθοδοι με τις οποίες διαπιστώνεται άμεσα το A. phagocytophilum

Σε αυτές περιλαμβάνονται η κυτταρολογική εξέταση, η PCR και η καλλιέργεια του *A. phagocytophilum.*

Όπως προαναφέρθηκε, το *A. phagocytophilum* προσβάλλει τα κύτταρα του αίματος. Έτσι, η επιβεβαίωση της μόλυνσης, γίνεται με την άμεση παρατήρηση του βακτηρίου στο επίχρισμα του αίματος ύστερα από χρώση

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

του με χρώσεις τύπου Romanowsky. Το βακτήριο εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα των λευκών αιμοσφαιρίων, έχει χρώμα σκούρο μωβ και συνήθως είναι σε ομάδες (Shabana et al., 2018). Το βακτήριο ανευρίσκεται στα λευκά αιμοσφαίρια από την 3^{η} έως και την 15^{η} ημέρα μετά τη μόλυνση (Whist et al., 2002), αν και έχει αναφερθεί η ανεύρεσή του στα κύτταρα και 175 ημέρες μετά (Stuen et al., 1998), γεγονός που θα μπορούσε να οφείλεται σε επαναμολύνσεις ή σε χρόνια λοίμωξη.

Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του γενετικού υλικού του *A. phagocytophilum*. Ειδικότερα, για τη μέθοδο TaqMan-PCR (TM-PCR) που ανιχνεύει το γονίδιο *msp2*, αναφέρεται μεγάλη ευαισθησία για ποικίλα στελέχη *A. phagocytophilum.* Η μέθοδος αυτή ανιχνεύει μέχρι και ένα αντίγραφο του πλασμιδίου και μεγάλο εύρος γενετικά διαφορετικών στελεχών *A. phagocytophilum.* Επίσης, πρόκειται για μέθοδο με υψηλή ειδικότητα καθώς δεν ενισχύει περιοχές- στόχους άλλων γενετικά συγγενών βακτηρίων (Drazenovich et al., 2006). Η ανίχνευσή του μπορεί να γίνει από την 2^{η} κιόλας ημέρα μετά τη μόλυνση και σε ορισμένες περιπτώσεις έως την 100^{η} ημέρα (Stuen et al., 2008; Stuen et al., 2011). Η PCR πραγματοποιείται κυρίως σε ολικό αίμα αλλά και στη στοιβάδα των λευκών αιμοσφαιρίων και αιμοπεταλίων στα μηρυκαστικά (Pusterla et al., 1997; Pusterla et al., 1999; Pusterla et al., 1998). Έχει αναφερθεί όμως και PCR στον ορό του αίματος των αιγών (Kawahara et al., 2006), καθώς και σε διάφορους ιστούς, όπως στο μυελό των οστών, το έντερο, τους νεφρούς και τους λεμφαδένες στο πρόβατο (Stuen et

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

al., 2006). Τέλος, γάλα από μολυσμένες αγελάδες, βρέθηκε θετικό στο *A. phagocytophilum* με τη μέθοδο της PCR (Pusterla et al., 1997).

Η πρώτη απομόνωση του *A. phagocytophilum* από αίμα ανθρώπου, ανακοινώθηκε το 1996 (Goodman et al., 1996). Αργότερα, στέλεχος του βακτηρίου απομονώθηκε από αίμα προβάτου σε δύο κυτταρικές σειρές κροτώνων, τις IDE8 και ISE6. Η *in vitro* καλλιέργεια και απομόνωση του *A. phagocytophilum* σε κυτταροκαλλιέργειες χρησιμοποιείται κυρίως για ερευνητικούς και όχι για διαγνωστικούς σκοπούς (Woldehiwet et al., 2002).

1.4.2. Μέθοδοι με τις οποίες διαπιστώνεται έμμεσα το A. phagocytophilum

Οι ορολογικές μέθοδοι ανίχνευσης αντισωμάτων (έμμεσος ανοσοφθορισμός, ELISA) χρησιμοποιούνται ευρέως για τον έλεγχο της έκθεσης στο *A. phagocytophilum*. Το θετικό αποτέλεσμα της ορολογικής εξέτασης είναι ενδεικτικό πιθανής έκθεσης στο *A. phagocytophilum*, χωρίς όμως να προσδιορίζει την κλινική μορφή της νόσου ή να αποκλείει το ενδεχόμενο της ασυμπτωματικής μόλυνσης και της διατήρησης του θετικού τίτλου μετά την αυτοϊαση, τη φαρμακευτική ίαση ή τη μόλυνση από κάποιο άλλο είδος του γένους *Anaplasma* (Waner et al., 2001). Στα μηρυκαστικά έχει αναφερθεί ότι τα αντισώματα παραμένουν για τουλάχιστον 21 (Stuen and Artursson, 2000) έως και 480 μέρες (Paxton and Scott, 1989) μετά την πειραματική μόλυνση. Επιπλέον, ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα περιγράφονται τις πρώτες ημέρες

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

μετά τη μόλυνση λόγω του χρόνου που απαιτείται για την ανάπτυξη των αντισωμάτων (Shabana et al., 2018). Συνήθως αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται σε επιδημιολογικές μελέτες, όπου προσδιορίζεται το ποσοστό των ζώων που έχουν εκτεθεί στο *A. phagocytophilum* σε συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές (Amusategui et al., 2006; de la Fuente et al., 2005; Moretta et al., 2019).

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Μέχρι σήμερα, στις περισσότερες μελέτες παρουσιάζονται μεταβολές στις τιμές των αιματολογικών παραμέτρων των μηρυκαστικών κυρίως ύστερα από πειραματική μόλυνση, ενώ ακόμη και σε φυσικά περιστατικά αναπλάσμωσης δεν διερευνήθηκε πιθανή σχέση των ευρημάτων της αιματολογικής εξέτασης με τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε για τη διάγνωση. Επιπλέον, συνήθως περιγράφονται τα αποτελέσματα που αφορούν σε αριθμητικές μεταβολές των κυττάρων του αίματος χωρίς να αξιολογείται η μορφολογία των κυττάρων.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι ο έλεγχος πιθανής σχέσης της παρουσίας των αντισωμάτων ή του αντιγόνου, στην ορολογική ή/και στην κυτταρολογική εξέταση, αντίστοιχα, στον αριθμό και τη μορφολογία των κυττάρων του αίματος στα πρόβατα.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

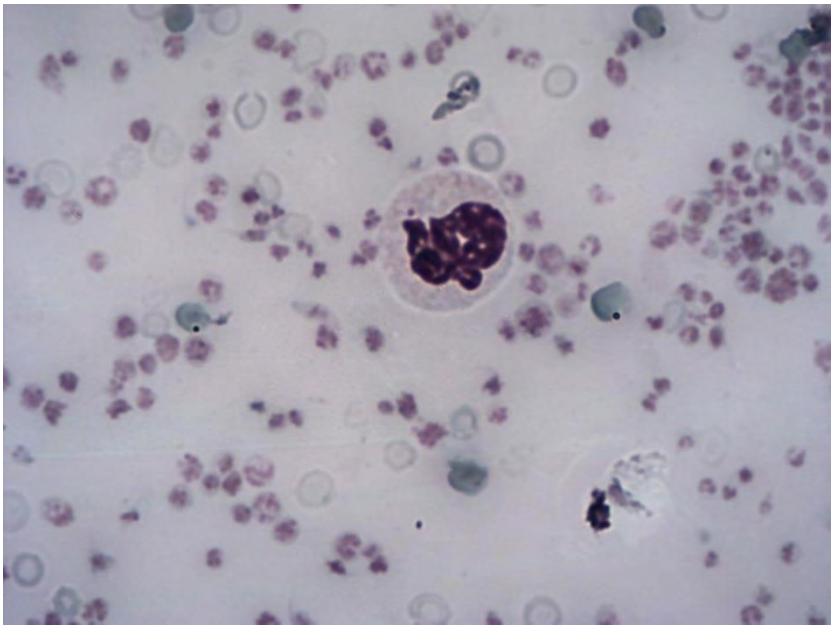
3. ΜΕΘΟΔΟΙ – ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν 138 πρόβατα της φυλής Χίου από 6 εκτροφές. Τα κριτήρια ένταξης στη μελέτη ήταν: α) η παρουσία κροτώνων, β) η απουσία άλλων εξωπαρασίτων, όπως μύγες και φθείρες, γ) αποπαρασίτωση για ενδοπαράσιτα τουλάχιστον δύο μήνες πριν την ένταξή τους στη μελέτη και δ) καμία κυτταρολογική ή ορολογική ένδειξη για την παρουσία άλλων κροτωνογενών νοσημάτων (*Borrelia burgdorferi*, *Babesia* sp. *Theileria* sp*)*.

Από το κάθε ζώο, συλλέχθηκε ολικό αίμα από τη σφαγίτιδα φλέβα σε ένα φιαλίδιο με αντιπηκτικό (EDTA) και σε ένα φιαλίδιο χωρίς αντιπηκτικό. Αμέσως μετά την αιμοληψία έγινε προσδιορισμός του αιματοκρίτη με τη μέθοδο του μικροαιματοκρίτη, καθώς και φυγοκέντρηση του αίματος από το φιαλίδιο με αντιπηκτικό για το διαχωρισμό της στοιβάδας των λευκών αιμοσφαιρίων και αιμοπεταλίων (Buffy coat). Από κάθε δείγμα έγιναν δύο επιχρίσματα από το ολικό αίμα και δύο επιχρίσματα από το buffy coat. Όλα τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο Διαγνωστικό Εργαστήριο της Παθολογικής Κλινικής του Τμήματος Κτηνιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Στα επιχρίσματα από το buffy coat ύστερα από χρώση Giemsa, ελέγχθηκαν 500 λευκά αιμοσφαίρια για την παρουσία του *A. phagocytophilum* (Pusterla et al., 1998) χρησιμοποιώντας καταδυτικό αντικειμενικό φακό 100Χ και τελική μεγέθυνση 1000Χ (**Εικόνα 1**).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248



Εικόνα 1. Κυτταρολογική εξέταση επιχρίσματος αίματος προβάτου, όπου διαπιστώθηκε η παρουσία *Anaplasma phagocytophilum* σε ουδετερόφιλο, χρώση Giemsa, 1000X

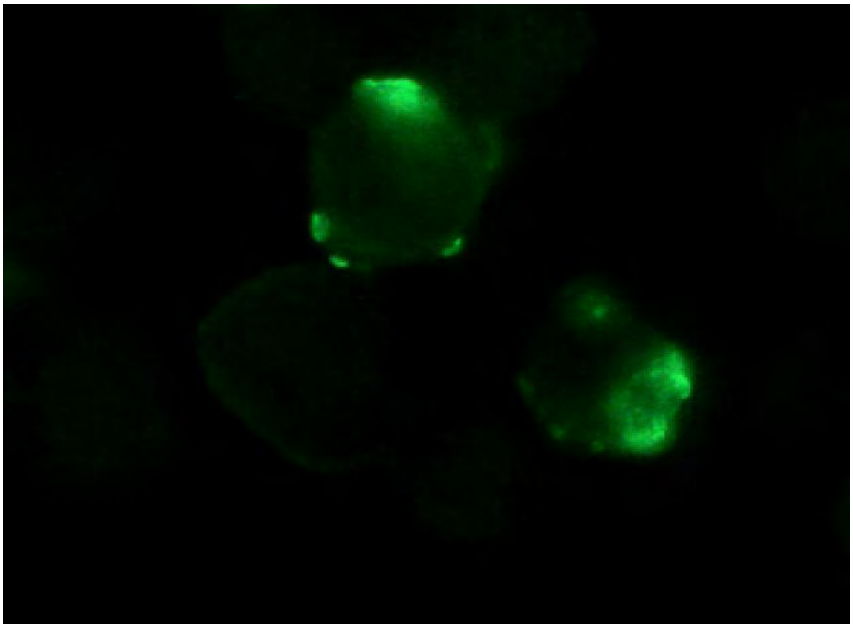
Στο επίχρισμα του ολικού αίματος ύστερα από χρώση Giemsa, έγινε ο προσδιορισμός του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων και των αιμοπεταλίων, όπως έχει περιγράφει σε προηγούμενη μελέτη (Katsogiannou et al., 2020). Ως όρια αναφοράς των αιματολογικών παραμέτρων χρησιμοποιήθηκαν τα δημοσιευμένα όρια αναφοράς για τη φυλή Χίου (Oikonomidis et al., 2018). Σημειώνεται ότι η αξιολόγηση που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων και των αιμοπεταλίων έγινε στο ίδιο εργαστήριο (Διαγνωστικό Εργαστήριο, Τμήμα Κτηνιατρικής, ΑΠΘ) και στον ίδιο αιματολογικό αναλυτή (ADVIA 120, Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA), απ' όπου προσδιορίστηκαν και δημοσιεύτηκαν τα όρια αναφοράς.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Στα ίδια επιχρίσματα υπολογίστηκε ο λευκοκυτταρικός τύπος με την παρατήρηση 200 κυττάρων και υπολογίστηκε ο απόλυτος αριθμός των επιμέρους λευκών αιμοσφαιρίων. Επίσης ελέγχθηκε η μορφολογία των κυττάρων για τυχόν ανωμαλίες. Πιο συγκεκριμένα έγινε έλεγχος για την παρουσία εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων, άωρων ουδετεροφίλων, τοξικών ουδετεροφίλων, ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων και μονοκυττάρων τα οποία ταξινομήθηκαν με βάση σχετικό πρωτόκολλο που ακολουθείται για τα αιματολογικά δεδομένα (Weiss, 1984).

Το φιαλίδιο χωρίς αντιπηκτικό φυγοκεντρήθηκε στις 3000rpm για 10 λεπτά. Ο ορός που συλλέχθηκε μετά τη φυγοκέντρηση αποθηκεύτηκε στους -20^{o}C μέχρι που χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση του έμμεσου ανοσοφθορισμού (IFAT) για τον προσδιορισμό του τίτλου των ειδικών κατά του *A. phagocytophilum* IgG αντισωμάτων. Για την πραγματοποίηση της μεθόδου του έμμεσου ανοσοφθορισμού χρησιμοποιήθηκαν διαθέσιμες στο εμπόριο πλάκες με κύτταρα μολυσμένα με *A. phagocytophilum* (MegaFLUO® ANAPLASMA ph. Horbranz, Austria) καθώς και διαθέσιμο στο εμπόριο σύζευγμα (anti-sheep IgG, rabbit fluorescein isothiocyanate-conjugated, Sigma-Aldrich, St Luis, MO, USA). Ως όριο διαχωρισμού (cut-off) χρησιμοποιήθηκε η αραίωση 1/40 (Stuen et al., 2011). Στην **Εικόνα 2** φαίνεται φθορίζει το *A. phagocytophilum* κατά τον έμμεσο ανοσοφθορισμό.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248



Εικόνα 2. Έμμεσος ανοσοφθορισμός παρουσία φθοριζόντων *Anaplasma phagocytophilum*, 1000Χ

Με βάση τα αποτελέσματα από τις μεθόδους προσδιορισμού των αντισωμάτων ή του αντιγόνου του *A. phagocytophilum,* τα ζώα κατηγοριοποιήθηκαν σε τέσσερις ομάδες:

Ομάδα Α: πρόβατα θετικά στην παρουσία του αντιγόνου του *A. phagocytophilum*

Ομάδα Β: πρόβατα θετικά και στις δύο μεθόδους ανίχνευσης του αντιγόνου και των αντισωμάτων

Ομάδα Γ: πρόβατα θετικά στην ανίχνευση των αντισωμάτων και

Ομάδα Δ: πρόβατα αρνητικά και στις δύο μεθόδους.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Οι διαφορές των αριθμών των κυττάρων του αίματος (WBC, Neu, Band Neu, Lymph, Mono, Eos, Baso, PLTs) και του αιματοκρίτη ανάμεσα στις τέσσερις ομάδες αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το στατιστικό πρόγραμμα IBM SPSS Statistics 25. Η κανονικότητα των αποτελεσμάτων εκτιμήθηκε με το Kolmogorov-Smirnov test και η ομοιογένεια των διακυμάνσεων με το Levene test. Για τον προσδιορισμό της στατιστικής σημαντικότητας των διαφορών για κάθε παράμετρο με κανονική κατανομή, ανάμεσα στις ομάδες χρησιμοποιήθηκε η απλή ανάλυση διακύμανσης (One-way ANOVA). Μετά τις αναλύσεις, έγινε συγκριτική ανάλυση των διαφορών με το Bonferroni ή το Tamhane T2 test ανάλογα με το αν οι διακυμάνσεις ήταν ομοιογενείς ή όχι, αντίστοιχα. Τα δεδομένα για τα άωρα ουδετερόφιλα αναλύθηκαν με τα Kruskal-Wallis και Mann-Whitney U tests, λόγω της μη κανονικής κατανομής. Τα αποτελέσματα διατυπώθηκαν ως μέσος όρος± τυπικό σφάλμα. Η σημαντικότητα ορίστηκε κάτω από 0,05 (P≤0,05) σε όλες τις συγκρίσεις. Επίσης, οι διαφορές των ποσοστών των προβάτων μεταξύ των ομάδων στα οποία διαπιστώθηκαν τιμές των αιματολογικών παραμέτρων εκτός των ορίων αναφοράς, υπολογίστηκαν στο λογισμικό Medcalc® statistical software.

Το ελάχιστο απαιτούμενο μέγεθος δείγματος υπολογίστηκε με ανάλυση ισχύος χρησιμοποιώντας το «General Linear Multivariate Model» με το «Wilks Likelihood Ratio» στο λογισμικό GLIMMPSE (http://glimmpse.samplesizeshop.org/). Η ισχύς της ανάλυσης ορίστηκε στο 0,8, το ποσοστό σφάλματος τύπου I ορίστηκε στο 0,05 και η επιθυμητή ανιχνεύσιμη διαφορά του αριθμού των κυττάρων του αίματος ανάμεσα στις

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

ομάδες, στο 10% με τυπική απόκλιση 10%. Ο συντελεστής μεταβλητότητας των μέσων ορίστηκε στο 1 και των τυπικών αποκλίσεων στο 2.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης ισχύος έδειξαν ότι ο ελάχιστος συνολικός αριθμός δειγμάτων που απαιτούνται για τη μελέτη είναι 48 (12 ανά ομάδα, Power=0,803).

Από τα 138 δείγματα που εξετάστηκαν, 17 ήταν θετικά ως προς την ανίχνευση του αντιγόνου και αρνητικά ως προς την ανίχνευση των αντισωμάτων (Ομάδα Α), 16 ήταν θετικά και στις δύο μεθόδους (Ομάδα Β), 16 βρέθηκαν θετικά για την παρουσία των αντισωμάτων και αρνητικά για την παρουσία του αντιγόνου (Ομάδα Γ), ενώ τα 89 ήταν αρνητικά και στις δύο μεθόδους (Ομάδα Δ).

Οι μέσοι όροι των αιματολογικών παραμέτρων ανά ομάδα προβάτων παρουσιάζονται στον **Πίνακα 7**. Παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά σε PCV, PLT και WBC ανάμεσα στην Ομάδα Α και των άλλων ομάδων, όπως και ανάμεσα στην Ομάδα Β και των υπόλοιπων ομάδων. Πιο συγκεκριμένα, και στις τρεις παραμέτρους, ο μέσος όρος των τιμών της Ομάδας Β ήταν

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

στατιστικώς πιο χαμηλός από τον μέσο όρο των υπολοίπων Ομάδων, ακολουθούμενος από το μέσο όρο των τιμών της Ομάδας Α, που ήταν στατιστικώς πιο χαμηλός από τις Ομάδες Γ και Δ. Ο μέσος όρος των τιμών της Ομάδας Γ είναι χαμηλότερος από της Ομάδας Δ, χωρίς όμως να έχει στατιστικώς σημαντική διαφορά.

Πίνακας 7. *Μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα για τον αιματοκρίτη (PCV), τον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων (WBCs) και τον αριθμό των αιμοπεταλίων (PLTs) στο περιφερικό αίμα προβάτων ανά ομάδα και σύγκριση μεταξύ των ομάδων*

Παράμετρος	Ομάδα	Αριθμός Δειγμάτων	Μέσος όρος	Τυπικό σφάλμα
PCV	Α	17	27,59[a]	0,59
	Β	16	24,06[b]	0,37
	Γ	16	30,94[c]	0,94
	Δ	89	32,90[c]	0,27
WBCs	Α	17	4588,24[a]	219,44
	Β	16	3318,75[b]	213,55
	Γ	16	7293,75[c]	742,94
	Δ	89	8802,25[c]	240,17
PLTs	Α	17	241176,47[a]	19502,68
	Β	16	168937,50[b]	14861,99
	Γ	16	438312,50[c]	33680,94
	Δ	89	511157,30[c]	15401,55

**Οι τιμές με διαφορετικό δείκτη υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντική διαφορά*

***Ομάδα Α: πρόβατα θετικά στην παρουσία του αντιγόνου του A. phagocytophilum, Ομάδα Β: πρόβατα θετικά στην παρουσία του αντιγόνου και των αντισωμάτων κατά του A. phagocytophilum, Ομάδα Γ: πρόβατα θετικά στην παρουσία των αντισωμάτων κατά του A. phagocytophilum. Ομάδα Δ: πρόβατα αρνητικά και στις δύο μεθόδους*

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Όσον αφορά τα επιμέρους κύτταρα των WBCs, οι τιμές των μέσων τους ανά ομάδα προβάτων, παρουσιάζονται στον **Πίνακα 8**. Στατιστικώς σημαντική διαφορά υπήρξε τόσο στα ώριμα ουδετερόφιλα ανάμεσα σε όλες τις ομάδες, όσο και στα άωρα ουδετερόφιλα της Ομάδας Β από όλες τις υπόλοιπες ομάδες. Πιο συγκεκριμένα, ο μέσος όρος των τιμών των ουδετεροφίλων της Ομάδας Β ήταν στατιστικώς σημαντικά πιο χαμηλός από όλες τις Ομάδες, ο μέσος όρος των τιμών της Ομάδας Γ ήταν σημαντικά πιο χαμηλός από της Ομάδας Α και Δ και τέλος ο μέσος όρος των τιμών της Ομάδας Γ ήταν στατιστικός πιο χαμηλός από της Ομάδας Δ. Όσον αφορά στα άωρα ουδετερόφιλα, στατιστικώς σημαντικά πιο αυξημένος ήταν ο μέσος όρος των τιμών της Ομάδας Β σε σχέση με των άλλων Ομάδων.

Επιπλέον, σημαντικές διαφορετικές υπήρξαν και στο μέσο όρο των τιμών των εωσινοφίλων και των λεμφοκυττάρων. Οι μέσοι όροι των τιμών και των δύο παραμέτρων της Ομάδας Β ήταν χαμηλότεροι από των άλλων Ομάδων, αλλά στατιστικώς σημαντικά χαμηλότεροι από των Ομάδων Γ και Δ. Στατιστικώς σημαντικά χαμηλότεροι ήταν και οι μέσοι όροι των τιμών της Α Ομάδας από τις Ομάδες Γ και Δ. Σημαντική διαφορά δεν υπήρχε ανάμεσα στους μέσους όρους των τιμών των δύο παραμέτρων των Ομάδων Γ και Δ, με της Ομάδας Γ να είναι χαμηλότεροι. Όσον αφορά τα μονοκύτταρα, στατιστικώς σημαντική διαφορά υπάρχει μόνο ανάμεσα στο μέσο όρο των τιμών της Ομάδας Β με της Ομάδας Δ, με της Ομάδας Β να είναι ο χαμηλότερος. Ακολουθεί ο μέσος όρος των τιμών της Ομάδας Α και της Ομάδας Δ, με υψηλότερο το μέσο όρο της Ομάδας Γ.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Πίνακας 8. *Μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα για τα επιμέρους κύτταρα των λευκών αιμοσφαιρίων (WBCs) στο περιφερικό αίμα των προβάτων ανά ομάδα και σύγκριση μεταξύ των ομάδων*

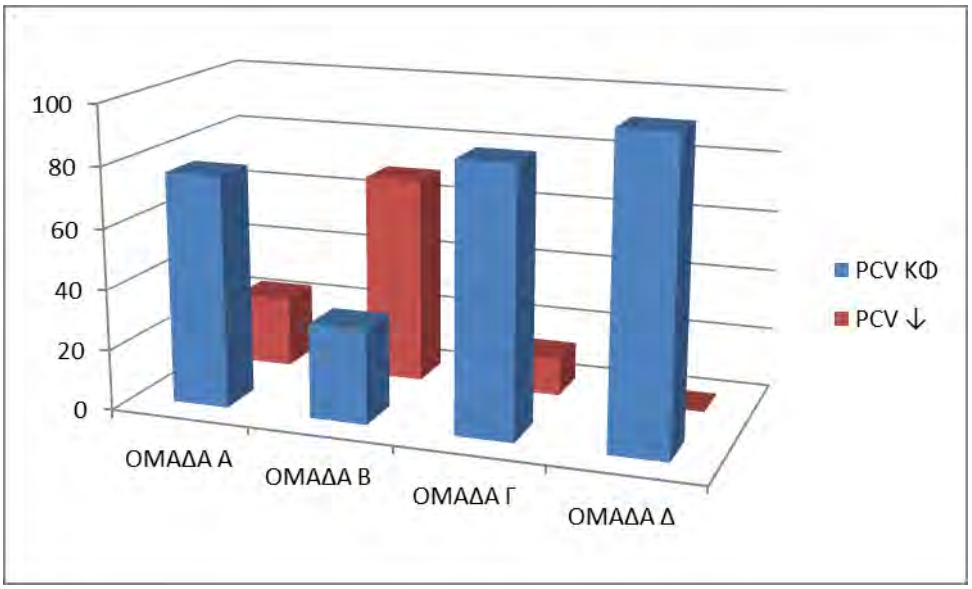
Παράμετρος	Ομάδα	Αριθμός Δειγμάτων	Μέσος όρος	Τυπικό σφάλμα
NEU	Α	17	2302,94[a]	131,56
	Β	16	741,87[b]	114,90
	Γ	16	1683,75[c]	170,93
	Δ	89	3096,52[d]	135,21
BAND NEU	Α	17	0,00[a]	0,00
	Β	16	23,75[b]	6,32
	Γ	16	0,00[a]	0,00
	Δ	89	0,00[a]	0,00
EOS	Α	17	179,41[a]	26,41
	Β	16	112,50[a]	33,39
	Γ	16	356,25[b]	45,51
	Δ	89	377,87[b]	18,73
LYMPH	Α	17	2004,71[a]	167,46
	Β	16	2396,25[a]	119,14
	Γ	16	5058,75[b]	592,51
	Δ	89	5162,75[b]	157,80
MONO	Α	17	101,18[ab]	24,61
	Β	16	44,38[a]	8,11
	Γ	16	195,00[ab]	50,12
	Δ	89	165,11[b]	17,29

**Οι τιμές με διαφορετικό δείκτη υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντική διαφορά*

***Ομάδα Α: πρόβατα θετικά στην παρουσία του αντιγόνου του A. phagocytophilum, Ομάδα Β: πρόβατα θετικά στην παρουσία του αντιγόνου και των αντισωμάτων κατά του A. phagocytophilum, Ομάδα Γ: πρόβατα θετικά στην παρουσία των αντισωμάτων κατά του A. phagocytophilum. Ομάδα Δ: πρόβατα αρνητικά και στις δύο μεθόδους*

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Τα κυριότερα ευρήματα των αιματολογικών εξετάσεων όλων των ομάδων των προβάτων που ήταν θετικά τουλάχιστον σε μία μέθοδο, ήταν αναιμία, λευκοπενία, θρομβοκυτταροπενία, ουδετεροπενία και λεμφοπενία. Το ποσοστό των ζώων ανά ομάδα που εμφάνισαν καθένα από τα παραπάνω ευρήματα απεικονίζεται στα **Γραφήματα 7-11.**

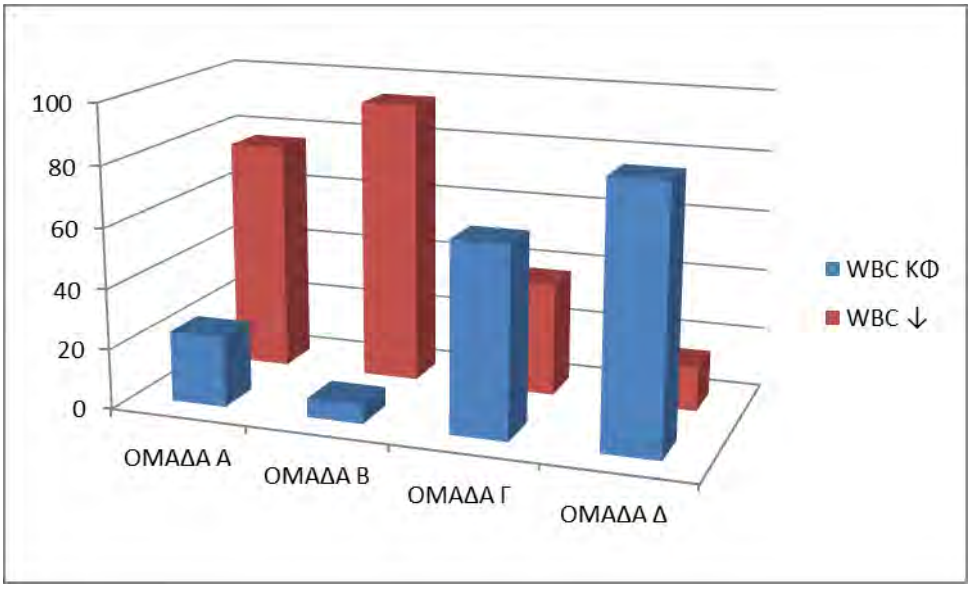


Γράφημα 7. *Γραφική παράσταση στην οποία αποτυπώνεται το ποσοστό των προβάτων ανά ομάδα, στα οποία ο αιματοκρίτης ήταν εντός (PCV ΚΦ) και εκτός (PCV ↓) των ορίων αναφοράς, αντίστοιχα*

Όσον αφορά στον αιματοκρίτη, στην Ομάδα Α, 4 πρόβατα εμφάνισαν αναιμία (23,5%), στην Ομάδα Β, 5 πρόβατα (31,25%) εμφάνισαν αναιμία και 14 στην Ομάδα Γ (87,5%). Τα υπόλοιπα πρόβατα των ομάδων αυτών, καθώς και όλα τα πρόβατα της Ομάδας Δ, είχαν αιματοκρίτη εντός των ορίων αναφοράς.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν σημαντική διαφορά (P<0,05) στα ποσοστά εμφάνισης αναιμίας μεταξύ των ποσοστών των Ομάδων Α και Β (P=0,0102), των Ομάδων Α και Δ (P<0,0001), των Ομάδων Β και Γ (P=0,0014), των Ομάδων Β και Δ (P<0,0001) και των Ομάδων Γ και Δ (P=0,0008), ενώ δεν υπήρχε διαφορά ανάμεσα στις Ομάδες Α και Γ (P=0,4199).



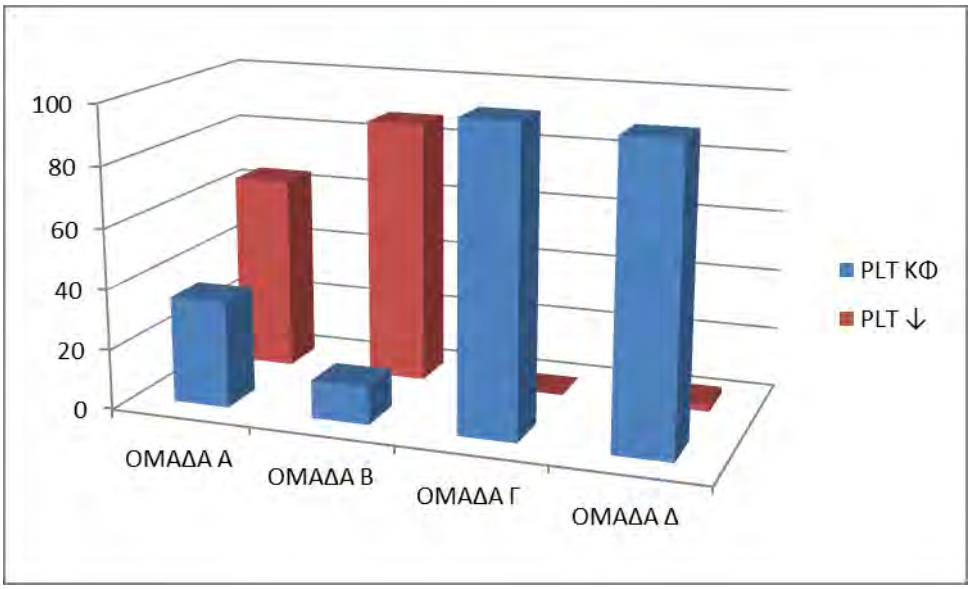
Γράφημα 8. *Γραφική παράσταση στην οποία αποτυπώνεται το ποσοστό των προβάτων ανά ομάδα, στα οποία ο συνολικός αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων ήταν εντός (WBC ΚΦ) και εκτός (WBC ↓) ορίων αναφοράς, αντίστοιχα*

Ο συνολικός αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων σε 13 πρόβατα της Ομάδας Α (76,5%), ήταν χαμηλότερος από το κατώτερο όριο αναφοράς. Στην Ομάδα Β, 15 πρόβατα εμφάνισαν λευκοπενία (93,75%). Στην Ομάδα Γ, ο αριθμός των προβάτων με λευκοπενία, ήταν 6 (37,5%), ενώ και στην Ομάδα Δ, ήταν 6

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

πρόβατα (14,6%). Ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων στα υπόλοιπα πρόβατα ήταν εντός των ορίων αναφοράς.

Η διαφορά ανάμεσα στα ποσοστά των Ομάδων Α και Γ είναι ήταν στατιστικώς σημαντική (P=0,027), όπως και ανάμεσα στα ποσοστά των Ομάδων Β και Γ (P=0,0010). Η διαφορά μεταξύ των ποσοστών των Ομάδων Α και Δ, καθώς και μεταξύ των Ομάδων Β και Δ, ήταν στατιστικώς σημαντική (P<0,0001), όπως και η διαφορά ανάμεσα στα ποσοστά των Ομάδων Γ και τη Δ (P=0,0292). Ωστόσο, δεν ήταν στατιστικώς σημαντική η διαφορά μεταξύ των ποσοστών των ομάδων Α και Β (P=0,1736).

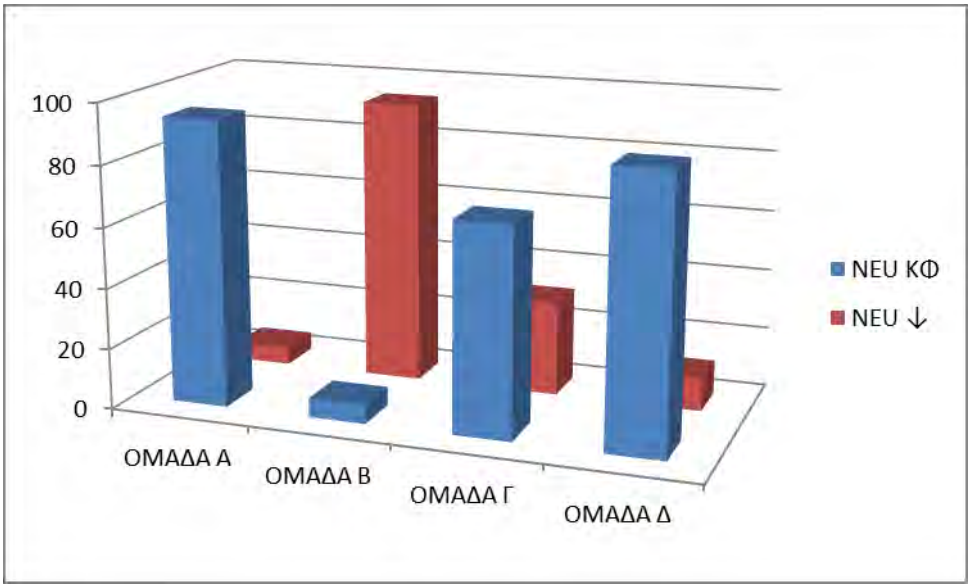


Γράφημα 9. *Γραφική παράσταση στην οποία αποτυπώνεται το ποσοστό των προβάτων ανά ομάδα, στα οποία ο αριθμός των αιμοπεταλίων ήταν εντός (PLT ΚΦ) και εκτός (PLT ↓) ορίων αναφοράς, αντίστοιχα*

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Θρομβοκυτταροπενία διαπιστώθηκε σε 11 πρόβατα της Ομάδας Α (64,7%), 14 πρόβατα της Ομάδας Β (87,5%) και 2 πρόβατα της Ομάδας Δ (2,25%).

Διαπιστώθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά, ανάμεσα στα ποσοστά των Ομάδων Α και Γ (P=0,0001), όπως και η διαφορά μεταξύ των ποσοστών των Ομάδων Α και Δ, Β και Γ, Β και Δ ήταν στατιστικώς σημαντική με P<0,0001. Δεν διαπιστώθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ποσοστών των Ομάδων Α και Β (P=0,1326), και μεταξύ των Ομάδων Γ και Δ (P=0,5466).

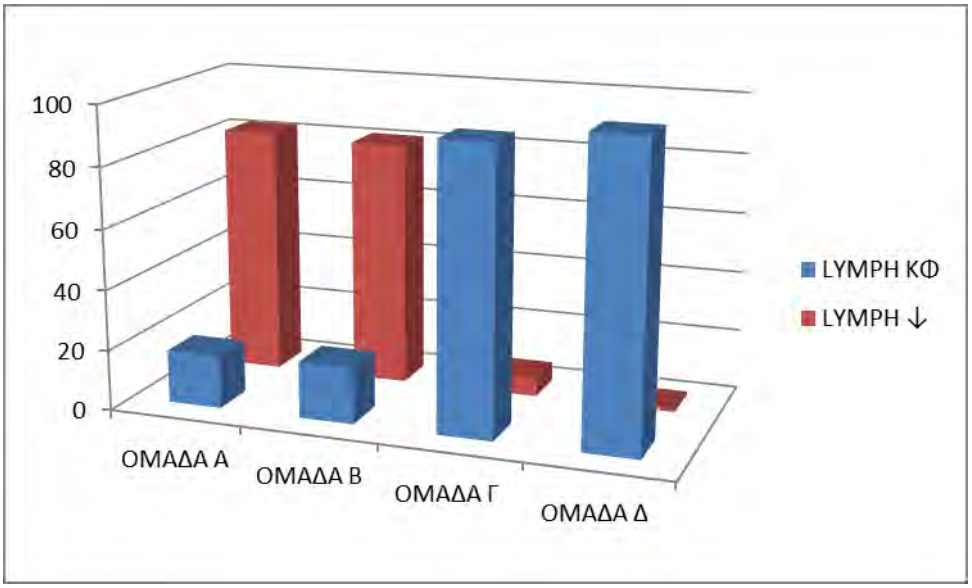


Γράφημα 10. *Γραφική παράσταση στην οποία αποτυπώνεται το ποσοστό των προβάτων ανά ομάδα, στα οποία ο αριθμός των ουδετεροφίλων ήταν εντός (NEU ΚΦ) και εκτός (NEU ↓) ορίων αναφοράς, αντίστοιχα*

Στην ομάδα Α διαπιστώθηκε ουδετεροπενία σε ένα πρόβατο (5,9%). Αντίθετα, στην Ομάδα Β, τα 15 από τα 16 πρόβατα είχαν ουδετεροπενία (93,75%), στην Ομάδα Γ, 5 πρόβατα (31,25%) και στην Ομάδα Δ, 10 πρόβατα (11,24%).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Στατιστικώς σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε ανάμεσα στα ποσοστά των ομάδων Α και Β (P<0,0001), ανάμεσα στα ποσοστά των Ομάδων Β και Γ (P=0,0003), των Ομάδων Β και Δ (P<0,0001) και των Ομάδων Γ και Δ (P=0,0361). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στα ποσοστά μεταξύ των Ομάδων Α και Γ (P=0,0632) και μεταξύ των Ομάδων Α και Δ (P=0,5104).



Γράφημα 11. *Γραφική παράσταση στην οποία αποτυπώνεται το ποσοστό των προβάτων ανά ομάδα, στα οποία ο αριθμός των λεμφοκυττάρων ήταν εντός (LYMPH ΚΦ) και εκτός (LYMPH ↓) ορίων αναφοράς, αντίστοιχα*

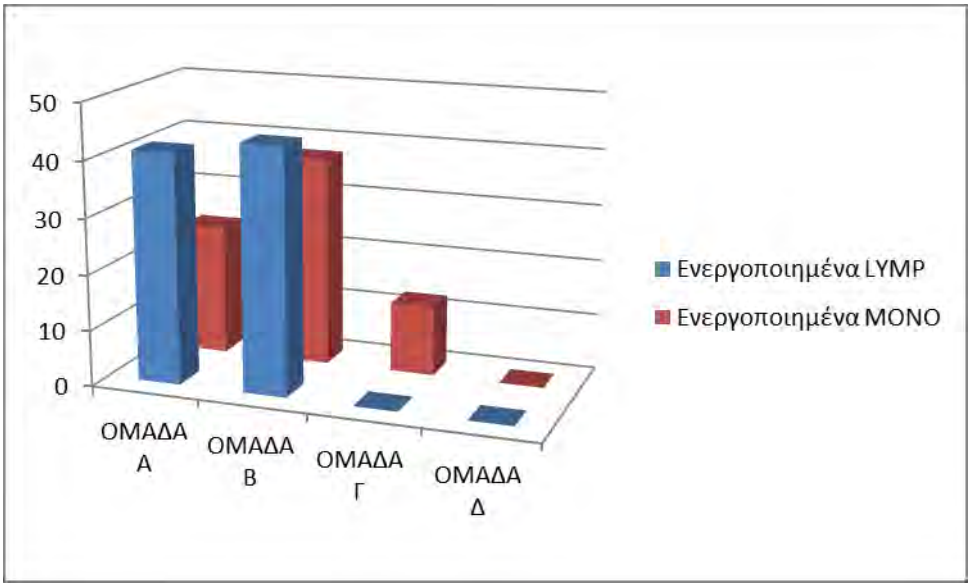
Λεμφοπενία διαπιστώθηκε σε 14 πρόβατα στην Ομάδα Α (82,36%), 13 πρόβατα στην Ομάδα Β (81,25%), και σε ένα μόνο πρόβατο, στις Ομάδες Γ και Δ (6,25% και 1,1%, αντίστοιχα).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Στατιστικώς σημαντική διαφορά διαπιστώθηκε ανάμεσα στα ποσοστά των Ομάδων Α και Γ, Α και Δ, Β και Γ, Β και Δ (P<0,0001), ενώ η διαφορά ανάμεσα στα ποσοστά των Ομάδων Α και Β δεν ήταν στατιστικώς σημαντική (P=0.9351), όπως και των Ομάδων Γ και Δ (P=0.1651).

Κατά τη μικροσκοπική εξέταση του επιχρίσματος του αίματος παρατηρήθηκαν ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα σε ορισμένα ζώα. Συγκεκριμένα, στην Ομάδα Α παρατηρήθηκαν ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα σε επιχρίσματα αίματος 7 προβάτων (41,2%) και ενεργοποιημένα μονοκύτταρα σε 4 (23,5%). Ομοίως, και στην Ομάδα Β, ανευρέθηκαν ενεργοποιημένα μονοκύτταρα σε επιχρίσματα 7 προβάτων (43,75%) και ενεργοποιημένα μονοκύτταρα σε επιχρίσματα 6 προβάτων (37,5%). Στην Ομάδα Γ, παρατηρήθηκαν μόνο ενεργοποιημένα μονοκύτταρα σε επιχρίσματα 2 προβάτων (12,5%), ενώ στην Ομάδα Δ δεν παρατηρήθηκαν τέτοια κύτταρα. Το ποσοστό των προβάτων ανά Ομάδα, στα οποία ανευρέθηκαν τα παραπάνω κύτταρα, απεικονίζεται στο **Γράφημα 12.**

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248



Γράφημα 12. *Γραφική παράσταση στην οποία αποτυπώνεται το ποσοστό των προβάτων ανά ομάδα, στα οποία παρατηρήθηκαν ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα ή μονοκύτταρα στο επίχρισμα του αίματος*

Στατιστικώς σημαντική διαφορά του ποσοστού των προβάτων στα οποία παρατηρήθηκαν ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα στο επίχρισμα του αίματος, διαπιστώθηκε ανάμεσα στις Ομάδες Α και Γ (P=0,0044), Β και Γ (P=0,0032) και τις Ομάδες Α και Δ, καθώς και Β και Δ (P<0,0001). Δεν υπήρχε σημαντική διαφορά ανάμεσα στα ποσοστά των Ομάδων Α και Β (P=0,8840).Όσον αφορά στα ενεργοποιημένα μονοκύτταρα, στατιστικώς σημαντική διαφορά διαπιστώθηκε ανάμεσα στα ποσοστά των Ομάδων Α και Δ καθώς και Β και Δ (P<0,0001) και ανάμεσα σε Γ και Δ (P=0,0008). Στατιστικώς σημαντική διαφορά δεν διαπιστώθηκε ανάμεσα στα ποσοστά των Ομάδων Α και Β (P=0,3890), των Ομάδων Α και Γ (P=0,4199) και των Ομάδων Β και Γ (P=1,080).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Τέλος, διαπιστώθηκε ένα τοξικό ουδετερόφιλο με διάχυτο βασίφιλο κυτταρόπλασμα, σε ένα επίχρισμα αίματος από πρόβατο που είχε ενταχθεί στην ομάδα Β.

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο ταξινόμησης των αιματολογικών αποτελεσμάτων, τόσο λόγω του αριθμού όσο και λόγω της σοβαρότητας (διάχυτο βασίφιλο κυττρόπλασμα), η εκφυλιστική μεταβολή ανήκει στο στάδιο Ι.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρουσία του αντιγόνου του *A. phagocytophilum* χωρίς την ανίχνευση αντισωμάτων είναι ενδεικτική πρόσφατης μόλυνσης. Προηγούμενες μελέτες σχετικά με την εμφάνιση και τη διάρκεια παραμονής των αντισωμάτων στο αίμα, ύστερα από πειραματική μόλυνση έδειξαν ότι τα αντισώματα μπορεί να ανιχνευθούν συνήθως την $7^{η}$ ημέρα και σπανιότερα την $5^{η}$ ημέρα μετά τη μόλυνση (Paxton and Scott, 1989) εμφανίζοντας τον υψηλότερο τίτλο περίπου την $14^{η}$ ημέρα (Stuen and Artursson, 2000; Stuen et al., 2009). Ο μικροοργανισμός, ωστόσο, ήταν ανιχνεύσιμος από την 3η ημέρα μετά τη μόλυνση (Gokce and Woldehiwet, 1999a; Whist et al., 2002).

Φαίνεται ότι τα αντισώματα είναι ανιχνεύσιμα στο αίμα τουλάχιστον 480 ημέρες μετά τη μόλυνση (Paxton and Scott, 1989), ενώ η παρουσία του

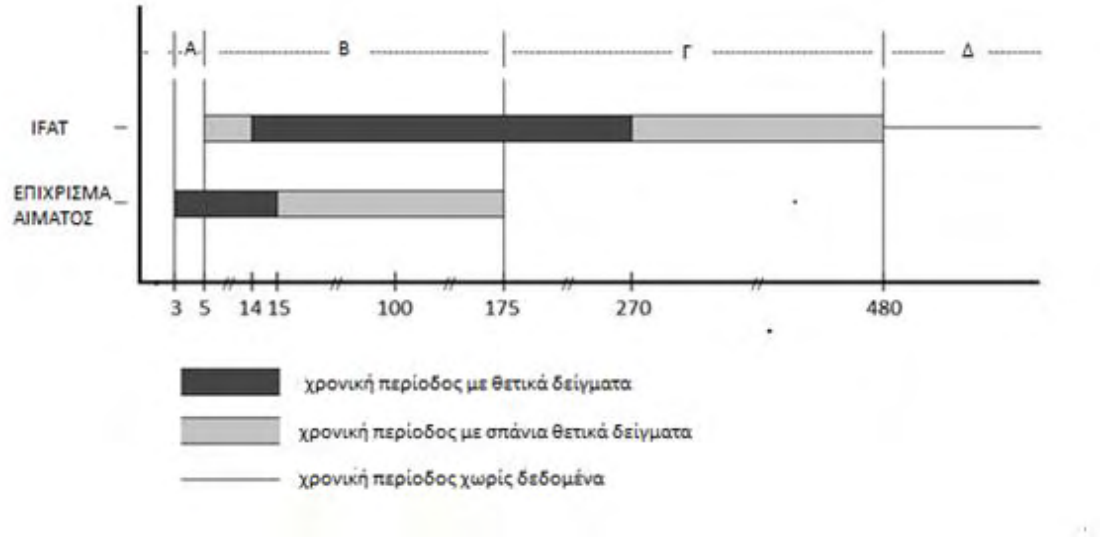
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

μικροοργανισμού διαπιστώθηκε σε κυτταρολογική εξέταση επιχρίσματος του αίματος μέχρι και 15 ημέρες μετά τη μόλυνση (Whist et al., 2002). Αν και σπάνια, αναφέρεται η παρουσία του μικροοργανισμού και μετά από 175 ημέρες μετά τη μόλυνση (Stuen et al., 1998). Η κινητική των αντισωμάτων ύστερα από πειραματική μόλυνση και η παρουσία του *A. phagocytophilum* στο επίχρισμα αίματος μετά τη μόλυνση απεικονίζονται στο **Γράφημα 13**.

Με βάση τα παραπάνω φαίνεται ότι χρονικά τα πρόβατα της ομάδας Α έχουν μολυνθεί πρόσφατα, ακολουθούν αυτά της Ομάδα Β, με τελευταία αυτά της ομάδας Γ. Όσον αφορά τα πρόβατα της Ομάδας Δ, που βρέθηκαν αρνητικά και στις δύο μεθόδους, μπορεί να θεωρηθεί είτε ότι δεν έχουν μολυνθεί ποτέ, χωρίς να αποκλείεται μια πολύ παλιά μόλυνση με πλήρη ίαση είτε βρίσκονται σε πολύ πρώιμο στάδιο της λοίμωξης.

Η πιο πιθανή θέση της μόλυνσης ή/και της έκθεσης των προβάτων κάθε ομάδας που δημιουργήθηκε στην παρούσα μελέτη με βάση τα αποτελέσματα της εξέτασης του αντιγόνου και του αντισώματος, παρουσιάζεται στο **Γράφημα 13.**

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248



Γράφημα 13. *Χρονική διάρκεια α)παρουσίας αντισωμάτων κατά του A. phagocytophilum (Paxton and Scott, 1989; Stuen and Artursson, 2000; Stuen et al., 2009) και β) ανίχνευσης εγκλείστων του βακτηρίου στα κύτταρα του αίματος κατά τη μικροσκοπική εξέταση του επιχρίσματος του αίματος (Gokce and Woldehiwet, 1999a; Stuen et al., 1998; Whist et al., 2002). Επιπλέον παρουσιάζεται η πιο πιθανή αντίστοιχη θέση της μόλυνσης ή/και της έκθεσης των προβάτων κάθε ομάδας*

**Ομάδα Α: πρόβατα θετικά στην παρουσία του αντιγόνου του A. phagocytophilum, Ομάδα Β: πρόβατα θετικά στην παρουσία του αντιγόνου και των αντισωμάτων κατά του A. phagocytophilum, Ομάδα Γ: πρόβατα θετικά στην παρουσία των αντισωμάτων κατά του A. phagocytophilum. Ομάδα Δ: πρόβατα αρνητικά και στις δύο μεθόδους.*

Σε ότι αφορά στις αιματολογικές παραμέτρους, στα πρόβατα που βρέθηκαν θετικά και στις δύο μεθόδους (Ομάδα Β) διαπιστώθηκε η χαμηλότερη μέση τιμή αιματοκρίτη και το μεγαλύτερο ποσοστό προβάτων με αναιμία. Μικρός όμως ήταν ο αριθμός των προβάτων που ήταν θετικά σε μία μόνο από τις μεθόδους και ταυτόχρονα εμφάνιζαν αναιμία. Σε προηγούμενη μελέτη (Gokce and Woldehiwet, 1999a), η χαμηλότερη τιμή του αιματοκρίτη διαπιστώθηκε την 10^{η} ημέρα μετά τη μόλυνση. Η χρονική αυτή στιγμή περιλαμβάνεται στο διάστημα που τα πρόβατα είναι θετικά και στις δύο μεθόδους όπως αποτυπώνεται στο **Γράφημα 13.**

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Όσον αφορά στα επιμέρους κύτταρα των λευκών αιμοσφαιρίων, παρατηρήθηκε ουδετεροπενία σε όλα σχεδόν τα πρόβατα που ήταν θετικά και στις δύο μεθόδους (Ομάδα Β) καθώς και σε μερικά που ήταν θετικά μόνο στη μέθοδο της ανίχνευσης των αντισωμάτων (Ομάδα Γ). Στην Ομάδα Β διαπιστώθηκε έντονη ουδετεροπενία, όσον αφορά στη μέση τιμή του αριθμού των ουδετεροφίλων αλλά και όσον αφορά στο ποσοστό των προβάτων που εμφάνισαν την ουδετεροπενία. Μη αισθητή μείωση των ουδετερόφιλων σε πρόβατα που πιθανώς βρίσκονταν σε πολύ πρώιμο στάδιο της λοίμωξης έχει αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες (Gokce and Woldehiwet, 1999a; Whist et al., 2002) γεγονός που επιβεβαιώνει τα πολύ χαμηλά ποσοστά ουδετεροπενίας που παρατηρήθηκαν στα ζώα της ομάδας Α. Η μη μεταβολή του αριθμού των ουδετεροφίλων στην αρχή της λοίμωξης μπορεί να οφείλεται και στο γεγονός ότι το *A. phagocytophilum*, παρατείνει την ημίσεια ζωή των ουδετεροφίλων καθυστερώντας την απόπτωσή τους, λόγω της αυξημένης παραγωγής κυτταροκινών (Scaife et al., 2003; Yoshiie et al., 2000).

Η ουδετεροπενία στο μετέπειτα στάδιο αποδίδεται τουλάχιστον εν μέρει στην καταστροφή τους, λόγω της παρασίτωσης. Συνήθως παρέρχονται πολλές εβδομάδες πριν την πλήρη αποκατάσταση του αριθμού των ουδετεροφίλων με τις προφανείς συνέπειες στην ανοσία του ζώου και την εξέλιξη του νοσήματος (Larsen et al., 1994).

Ο αριθμός των άωρων ουδετεροφίλων ήταν λίγο υψηλότερος, αλλά με στατιστικώς σημαντική διαφορά, στα πρόβατα που ήταν θετικά και στις δύο μεθόδους (Ομάδα Β). Στα μηρυκαστικά, ο αριθμός των ώριμων ουδετερόφιλων που αποθηκεύονται στο μυελό των οστών είναι χαμηλός. Έτσι,

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

σε μια οξεία φλεγμονώδη νόσο, υπάρχουν διαταραχές στην ωρίμανση των ουδετεροφίλων με αποτέλεσμα άωρα και τοξικά ουδετερόφιλα, όπως αυτό που διαπιστώθηκε στην παρούσα μελέτη, να απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος (Harvey, 2012).

Ο χαμηλότερος αριθμός των εωσινοφίλων στα ζώα που ήταν θετικά μόνο στην ανίχνευση του αντιγόνου αλλά και στα ζώα που ήταν θετικά και στις δύο μεθόδους έχει διαπιστωθεί και σε προηγούμενες μελέτες λόγω της καταστροφής των παρασιτούμενων κυττάρων (Ogden et al., 2003; Whist et al., 2002). Στην πρόκληση της εωσινοπενίας φαίνεται ότι συμβάλει και η καταπόνηση καθώς οι οξείες λοιμώξεις και φλεγμονές συνοδεύονται συχνά από εωσινοπενία (Brun-Hansen et al., 1998; Jain, 1993).

Σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες διαπιστώθηκε λεμφοπενία στα πρόβατα που ήταν θετικά τουλάχιστον στη μέθοδο της ανίχνευσης του αντιγόνου (Gokce and Woldehiwet, 1999a; Whist et al., 2002). Αναφέρεται ότι η σημαντική μείωση των λεμφοκυττάρων αφορά σημαντικότερη μείωση του αριθμού των Β λεμφοκυττάρων απ' ότι των Τ λεμφοκυττάρων στην κυκλοφορία του αίματος, όπως αρχικά διαπιστώθηκε ύστερα από πειραματική μόλυνση στα πρόβατα, χρησιμοποιώντας για την ταυτοποίηση των Β και Τ λεμφοκυττάρων ανοσοσφαιρίνη IgG και συγκολλητίνη, αντίστοιχα (Batungbacal et al., 1982). Στη μελέτη αυτή, ο αριθμός των λεμφοκυττάρων μειώθηκε από την 7^{η} ημέρα και επανήλθε μία εβδομάδα αργότερα. Σε μετέπειτα μελέτη, οι παραπάνω παρατηρήσεις επαληθεύτηκαν με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων, όπου διαπιστώθηκε ότι το *A. phagocytophilum* προκαλεί μείωση διαφορετικών υποπληθυσμών των Β (CD4+, CD8+) και Τ

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

λεμφοκυττάρων (Woldehiwet, 1991). Επίσης, έχει διαπιστωθεί ιστολογικά περιορισμός της λέμφου, του λεμφοειδούς ιστού του σπλήνα και των λεμφογαγγλίων σε ζώα με αναπλάσμωση (Hudson, 1950). Επιπλέον, αναφέρεται ότι τα λεμφοκύτταρα των μολυσμένων προβάτων παρουσιάζουν μειωμένη ανταπόκριση στα μιτογόνα, ενώ αναστέλλεται η προσκόλληση των ουδετεροφίλων και η φαγοκυττάρωση (Foster and Cameron, 1970; Woldehiwet, 1987a, b).

Στις ίδιες ομάδες ανιχνεύθηκαν ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα, ως αποτέλεσμα της αντιγονικής διέγερσης. Παρόλο που δεν υπάρχουν μελέτες που να αναφέρονται στη μορφολογία των κυττάρων σε πρόβατα με αναπλάσμωση, ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα αναφέρονται σε σκύλους ύστερα από φυσική και πειραματική μόλυνση με *Ehrlichia canis*, η παρουσία των οποίων επίσης αποδόθηκε σε αντιγονική διέγερση (Gianopoulos et al., 2016). Τα λεμφοκύτταρα μπορούν να ενεργοποιηθούν στην παρουσία πολλών και διαφορετικών αντιγόνων και γι’ αυτό δεν αποτελούν ειδικό εύρημα, όπως εξάλλου και τα ενεργοποιημένα μονοκύτταρα (Weiser, 2012).

Τα μονοκύτταρα φαίνεται ότι είναι τα λιγότερα προσβαλλόμενα από τον μικροοργανισμό (Ogden et al., 1998). Ο μικρότερος μέσος αριθμός μονοκυττάρων διαπιστώθηκε στα πρόβατα που ήταν θετικά και στις δύο μεθόδους. Αναφέρεται μείωση του αριθμού των μονοκυττάρων ύστερα από πειραματική μόλυνση με την εμφάνιση του πυρετού και αύξηση μετά την υποχώρηση των κλινικών συμπτωμάτων (Tuomi, 1967). Η αύξηση των μονοκυττάρων σε φλεγμονώδεις καταστάσεις, αναφέρεται ως αποτέλεσμα αυξημένης παραγωγής από τον μυελό των οστών για την κάλυψη των

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

αναγκών για φαγοκυττάρωση (Jain, 1993) Σε άλλη μελέτη (Purnell et al., 1977) ωστόσο, διαπιστώθηκε χαμηλός αριθμός μονοκυττάρων την $6^{η}$ και $7^{η}$ ημέρα μετά τη μόλυνση, χωρίς επακόλουθη αύξηση.

Όσον αφορά στον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων, παρατηρήθηκε λευκοπενία στις ομάδες των οποίων τα πρόβατα ήταν θετικά σε τουλάχιστον μία μέθοδο και κυρίως στις ομάδες με θετικό αποτέλεσμα στη μέθοδο της ανίχνευσης του αντιγόνου. Η χαμηλότερη μέση τιμή του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων διαπιστώθηκε στην Ομάδα Β, όπως και το μεγαλύτερο ποσοστό προβάτων με λευκοπενία. Τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι υπάρχει σημαντική λευκοπενία όσο ανευρίσκεται ο μικροοργανισμός στο αίμα. Η λευκοπενία διαπιστώθηκε και σε προηγούμενες μελέτες ύστερα από πειραματική μόλυνση με το *A. phagocytophilum* (Gokce and Woldehiwet, 1999a; Whist et al., 2002). Σύμφωνα με τα ευρήματα της παρούσης μελέτης, η λευκοπενία φαίνεται να είναι αποτέλεσμα των αλλαγών του αριθμού των επιμέρους κυττάρων των λευκών αιμοσφαιρίων και ειδικότερα των ουδετεροφίλων και των λεμφοκυττάρων.

Θρομβοκυτταροπενία και χαμηλότερη μέση τιμή των αιμοπεταλίων διαπιστώθηκε πρωτίστως στα πρόβατα που ήταν θετικά και στις δύο μεθόδους και μετά στα θετικά στη μέθοδο ανίχνευσης του αντιγόνου. Σε προηγούμενη μελέτη (Whist et al., 2002) η χαμηλότερη τιμή του αριθμού των αιμοπεταλίων είναι μεταξύ $5^{ης}$ και $10^{ης}$ ημέρας μετά τη μόλυνση, που βρίσκεται σε συμφωνία με την απεικόνιση των ομάδων των προβάτων της παρούσας μελέτης στο **Γράφημα 13**.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Σε άλλη μελέτη ωστόσο, η μείωση των αιμοπεταλίων διαπιστώνεται μεταξύ της 2ης και 8ης ημέρας και αποδίδεται στην ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων κατά την οξεία φάση (Brun-Hansen et al., 1998). Στους μηχανισμούς που προκαλούν μείωση των αιμοπεταλίων αναφέρεται και η πρόκληση καθυστέρησης της ωρίμανσης ή της απελευθέρωσης των αιμοπεταλίων από το μυελό των οστών (Gribble, 1969). Αναφέρεται, επίσης, ότι το *A. phagocytophilum* μπορεί να μολύνει τα μεγακαρυοκύτταρα των μυελού των οστών (Bakken et al., 1996; Foster and Cameron, 1968).

Όπως φαίνεται στην παρούσα μελέτη, παρουσιάζεται μεγάλη μείωση του αριθμού των κυττάρων του αίματος, στην οξεία φάση της λοίμωξης και όταν τα πρόβατα είναι θετικά και στις δύο μεθόδους.

Η πανκυτταροπενία είναι πιθανώς αποτέλεσμα της περιφερικής κατανάλωσης ή καταστροφής των κυττάρων του αίματος (Lepidi et al., 2000). Σε μια άλλη μελέτη υποστηρίζεται ότι η αιτία της πανκυτταροπενίας είναι η διατάραξη της φυσιολογικής αιμοποίησης λόγω μεταβολών της διαφοροποίησης των βλαστοκυττάρων, καθώς και του πολλαπλασιασμού και κινητοποίησης των κυττάρων του μυελού των οστών (Borjesson et al., 2009).

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Σε αυτή τη μελέτη, διαπιστώθηκαν ποσοτικές μεταβολές όλων των κυττάρων του αίματος, αλλά και μεταβολές στη μορφολογία των λευκών αιμοσφαιρίων.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Ο συνδυασμός λευκοπενίας και θρομβοκυτταροπενίας είναι το σημαντικότερο εργαστηριακό εύρημα που θέτει υποψία της νόσου. Επίσης, από κλινικής άποψης, η μειωμένη κυτταρική ανοσία (λευκοπενία) που διαπιστώθηκε στο διάστημα που εντοπίζονται ταυτόχρονα ο μικροοργανισμός και τα αντισώματα, δείχνει ότι την περίοδο αυτή τα ζώα είναι πιο ευάλωτα και συνεπώς χρειάζεται παρακολούθηση για την έγκαιρη αντιμετώπιση δευτερογενών επιπλοκών. Τα αποτελέσματα των αιματολογικών εξετάσεων μπορούν να βοηθήσουν στην ερμηνεία των θετικών ορολογικών αποτελεσμάτων, λόγω της μεγάλης χρονικής περιόδου που μπορεί να ανευρίσκονται αντισώματα σε ένα πρόβατο, ενώ σε συνδυασμό και με τις κυτταρολογικές εξετάσεις μπορεί να συμβάλλουν στην εκτίμηση του σταδίου του νοσήματος.

Οι μεταβολές που διαπιστώθηκαν είναι ενδεικτικές φλεγμονώδους αντίδρασης, αντιγονικής διέγερσης και καταπόνησης. Τα ευρήματα αυτά προσθέτουν στη γνώση των παθογενετικών μηχανισμών της αναπλάσμωσης των προβάτων και αναδεικνύουν την αξία της γενικής εξέτασης του αίματος και της αξιολόγησης της μορφολογίας των κυττάρων στην παρακολούθηση της εξέλιξης του νοσήματος.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Amusategui, I., Sainz, A., Tesouro, M.A., 2006. Serological evaluation of Anaplasma phagocytophilum infection in livestock in northwestern Spain. Ann N Y Acad Sci 1078, 487-490.

Bakken, J.S., Krueth, J., Wilson-Nordskog, C., Tilden, R.L., Asanovich, K., Dumler, J.S., 1996. Clinical and laboratory characteristics of human granulocytic ehrlichiosis. JAMA 275, 199-205.

Batungbacal, M.R., Scott, G.R., Burrells, C., 1982. The lymphocytopaenia in tick-borne fever. J Comp Pathol 92, 403-407.

Borjesson, D., Macnamara, K., Johns, J., Winslow, G., 2009. Anaplasma phagocytophilum and Ehrlichia muris induce cytopenias and global defects in hematopoiesis. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 15 Suppl 2, 66-67.

Brun-Hansen, H., Gronstol, H., Hardeng, F., 1998. Experimental infection with Ehrlichia phagocytophila in cattle. Zentralbl Veterinarmed B 45, 193-203.

de la Fuente, J., Torina, A., Caracappa, S., Tumino, G., Furla, R., Almazan, C., Kocan, K.M., 2005. Serologic and molecular characterization of Anaplasma species infection in farm animals and ticks from Sicily. Vet Parasitol 133, 357-362.

Drazenovich, N., Foley, J., Brown, R.N., 2006. Use of real-time quantitative PCR targeting the msp2 protein gene to identify cryptic Anaplasma

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

phagocytophilum infections in wildlife and domestic animals. Vector borne and zoonotic diseases 6, 83-90.

Dumler, J.S., 2005. Anaplasma and Ehrlichia infection. Ann N Y Acad Sci 1063, 361-373.

Dumler, J.S., Barbet, A.F., Bekker, C.P., Dasch, G.A., Palmer, G.H., Ray, S.C., Rikihisa, Y., Rurangirwa, F.R., 2001. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. Int J Syst Evol Microbiol 51, 2145-2165.

Dumler, J.S., Choi, K.S., Garcia-Garcia, J.C., Barat, N.S., Scorpio, D.G., Garyu, J.W., Grab, D.J., Bakken, J.S., 2005. Human granulocytic anaplasmosis and Anaplasma phagocytophilum. Emerg Infect Dis 11, 1828-1834.

Foggie, A., 1951. Studies on the infectious agent of tick-borne fever in sheep. J Pathol Bacteriol 63, 1-15.

Foster, W.N., Cameron, A.E., 1968. Thrombocytopenia in sheep associated with experimental tick-borne fever infection. J Comp Pathol 78, 251-254.

Foster, W.N., Cameron, A.E., 1970. Observations on the functional integrity of neutrophil leucocytes infected with tick-borne fever. J Comp Pathol 80, 487-491.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Gianopoulos, A., Mylonakis, M.E., Theodorou, K., Christopher, M.M., 2016. Quantitative and qualitative leukocyte abnormalities in dogs with experimental and naturally occurring acute canine monocytic ehrlichiosis. Vet Clin Pathol 45, 281-290.

Gokce, H.I., Woldehiwet, Z., 1999a. Differential haematological effects of tick-borne fever in sheep and goats. Zentralbl Veterinarmed B 46, 105-115.

Gokce, H.I., Woldehiwet, Z., 1999b. The effects of Ehrlichia (Cytoecetes) phagocytophila on the clinical chemistry of sheep and goats. Zentralbl Veterinarmed B 46, 93-103.

Gokce, H.I., Woldehiwet, Z., 1999c. Ehrlichia (Cytoecetes) phagocytophila predisposes to severe contagious ecthyma (Orf) in lambs. J Comp Pathol 121, 227-240.

Goodman, J.L., Nelson, C., Vitale, B., Madigan, J.E., Dumler, J.S., Kurtti, T.J., Munderloh, U.G., 1996. Direct cultivation of the causative agent of human granulocytic ehrlichiosis. N Engl J Med 334, 209-215.

Gribble, D.H., 1969. Equine ehrlichiosis. Journal of the American Veterinary Medical Association 155, 462-469.

Harvey, J.W., 2012. Evaluation of leukocytic disorders, In: Veterinary Hematology - Diagnostic Guide and Color Atlas. Elsevier, St Louis, Missouri, pp. 122-176.

Hudson, J.R., 1950. The Recognition of Tick-Borne Fever as a Disease of Cattle. British Veterinary Journal 106, 3-17.

Jain, N.C., 1993. Essentials of Veterinary Hematology. Lea and Febiger, Philadelphia, PA, USA.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Katsogiannou, E.G., Athanasiou, L.V., Katsoulos, P.D., Polizopoulou, Z.S., Tsivara, A., Christodoulopoulos, G., 2020. Estimation of white blood cell and platelet counts in ovine blood smears and comparison with the ADVIA 120 hematology analyzer. Vet Clin Path 49, 222-226

Kawahara, Y., Yamaoka, K., Iwata, M., Fujimura, M., Kajiume, T., Magaki, T., Takeda, M., Ide, T., Kataoka, K., Asashima, M., Yuge, L., 2006. Novel electrical stimulation sets the cultured myoblast contractile function to 'on'. Pathobiology 73, 288-294.

Larsen, H.J., Overnes, G., Waldeland, H., Johansen, G.M., 1994. Immunosuppression in sheep experimentally infected with Ehrlichia phagocytophila. Res Vet Sci 56, 216-224.

Lepidi, H., Bunnell, J.E., Martin, M.E., Madigan, J.E., Stuen, S., Dumler, J.S., 2000. Comparative pathology, and immunohistology associated with clinical illness after Ehrlichia phagocytophila-group infections. The American journal of tropical medicine and hygiene 62, 29-37.

Moretta, I., Veronesi, F., Diaferia, M., Morganti, G., Giusepponi, V., Sechi, P., Ciampelli, A., Cenci-Goga, B., 2019. Epidemiological survey on the occurrence of Anaplasma phagocytophilum infection in sheep reared in central Italy. Small Ruminant Research 181, 103-106.

Ogden, N.H., Casey, A.N., Woldehiwet, Z., French, N.P., 2003. Transmission of Anaplasma phagocytophilum to Ixodes ricinus ticks from sheep in the acute and post-acute phases of infection. Infection and immunity 71, 2071-2078.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Ogden, N.H., Woldehiwet, Z., Hart, C.A., 1998. Granulocytic ehrlichiosis: an emerging or rediscovered tick-borne disease? J Med Microbiol 47, 475-482.

Oikonomidis, I.L., Brozos, C., Kiossis, E., Kritsepi-Konstantinou, M., 2018. Combined and breed-specific RIs for hematologic, biochemical, and hormonal analytes in Chios and Florina adult rams. Vet Clin Pathol 47, 56-68.

Paxton, E.A., Scott, G.R., 1989. Detection of antibodies to the agent of tick-borne fever by indirect immunofluorescence. Vet Microbiol 21, 133-138.

Purnell, R.E., Young, E.R., Brocklesby, D.W., Hendry, D.J., 1977. The haematology of experimentally-induced B divergens and E phagocytophila infections in splenectomised calves. Vet Rec 100, 4-6.

Pusterla, N., Huder, J., Wolfensberger, C., Braun, U., Lutz, H., 1997. Laboratory findings in cows after experimental infection with Ehrlichia phagocytophila. Clinical and diagnostic laboratory immunology 4, 643-647.

Pusterla, N., Huder, J.B., Leutenegger, C.M., Braun, U., Madigan, J.E., Lutz, H., 1999. Quantitative real-time PCR for detection of members of the Ehrlichia phagocytophila genogroup in host animals and Ixodes ricinus ticks. Journal of clinical microbiology 37, 1329-1331.

Pusterla, N., Pusterla, J.B., Braun, U., Lutz, H., 1998. Serological, hematologic, and PCR studies of cattle in an area of Switzerland in which tick-borne fever (caused by Ehrlichia phagocytophila) is endemic. Clinical and diagnostic laboratory immunology 5, 325-327.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Scaife, H., Woldehiwet, Z., Hart, C.A., Edwards, S.W., 2003. Anaplasma phagocytophilum reduces neutrophil apoptosis in vivo. Infection and immunity 71, 1995-2001.

Scott, P.R., 2015. Parasitic Disease, In: Sheep Medicine, second ed. CRC Press, Broken Sound Parkway NW, pp. 347- 376.

Shabana, II, Alhadlag, N.M., Zaraket, H., 2018. Diagnostic tools of caprine and ovine anaplasmosis: a direct comparative study. BMC Vet Res 14, 165.

Stuen, S., Artursson, K., 2000. Effects of the dose of Ehrlichia phagocytophila on the severity of experimental infections in lambs. Vet Rec 146, 669-672.

Stuen, S., Braten, M., Bergstrom, K., Bardsen, K., 2008. Cyclic variation in lambs infected with Anaplasma phagocytophilum. Vet Rec 163, 338-340.

Stuen, S., Casey, A.N., Woldehiwet, Z., French, N.P., Ogden, N.H., 2006. Detection by the polymerase chain reaction of Anaplasma phagocytophilum in tissues of persistently infected sheep. J Comp Pathol 134, 101-104.

Stuen, S., Engvall, E.O., Artursson, K., 1998. Persistence of Ehrlichia phagocytophila infection in lambs in relation to clinical parameters and antibody responses. Vet Rec 143, 553-555.

Stuen, S., Grova, L., Granquist, E.G., Sandstedt, K., Olesen, I., Steinshamn, H., 2011. A comparative study of clinical manifestations, haematological and serological responses after experimental infection

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

with Anaplasma phagocytophilum in two Norwegian sheep breeds. Acta Vet Scand 53, 8.

Stuen, S., Torsteinbo, W.O., Bergstrom, K., Bardsen, K., 2009. Superinfection occurs in Anaplasma phagocytophilum infected sheep irrespective of infection phase and protection status. Acta Vet Scand 51, 41.

Torina, A., Galindo, R.C., Vicente, J., Di Marco, V., Russo, M., Aronica, V., Fiasconaro, M., Scimeca, S., Alongi, A., Caracappa, S., Kocan, K.M., Gortazar, C., de la Fuente, J., 2010. Characterization of Anaplasma phagocytophilum and A. ovis infection in a naturally infected sheep flock with poor health condition. Trop Anim Health Prod 42, 1327-1331.

Tuomi, J., 1967. Experimental studies on bovine tick-borne fever. 1. Clinical and haematological data, some properties of the causative agent, and homologous immunity. Acta Pathol Microbiol Scand 70, 429-445.

Waner, T., Harrus, S., Jongejan, F., Bark, H., Keysary, A., Cornelissen, A.W., 2001. Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by Ehrlichia canis. Vet Parasitol 95, 1-15.

Weiser, G., 2012. Interpretation of Leukocyte Responses in Disease, In: Veterinary Hematology and Clinical Chemistry, second ed. Wiley & Sons,, Ames, Iowa, USA, pp. 127- 139.

Weiss, D.J., 1984. Uniform evaluation and semiquantitative reporting of hematologic data in veterinary laboratories. Vet Clin Pathol 13, 27-31.

Whist, S.K., Storset, A.K., Larsen, H.J., 2002. Functions of neutrophils in sheep experimentally infected with Ehrlichia phagocytophila. Veterinary immunology and immunopathology 86, 183-193.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Woldehiwet, Z., 1987a. Depression of lymphocyte response to mitogens in sheep infected with tick-borne fever. J Comp Pathol 97, 637-643.

Woldehiwet, Z., 1987b. The effects of tick-borne fever on some functions of polymorphonuclear cells of sheep. J Comp Pathol 97, 481-485.

Woldehiwet, Z., 1991. Lymphocyte subpopulations in peripheral blood of sheep experimentally infected with tick-borne fever. Res Vet Sci 51, 40-43.

Woldehiwet, Z., 2008. Immune evasion and immunosuppression by Anaplasma phagocytophilum, the causative agent of tick-borne fever of ruminants and human granulocytic anaplasmosis. Vet J 175, 37-44.

Woldehiwet, Z., Horrocks, B.K., Scaife, H., Ross, G., Munderloh, U.G., Bown, K., Edwards, S.W., Hart, C.A., 2002. Cultivation of an ovine strain of Ehrlichia phagocytophila in tick cell cultures. J Comp Pathol 127, 142-149.

Yoshiie, K., Kim, H.Y., Mott, J., Rikihisa, Y., 2000. Intracellular infection by the human granulocytic ehrlichiosis agent inhibits human neutrophil apoptosis. Infection and immunity 68, 1125-1133.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διατριβή εστιάζεται στην αξιολόγηση φυσιολογικών παραγόντων, που δρουν πριν ή κατά τη διάρκεια της ανάλυσης των δειγμάτων αίματος καθώς και παθολογικών παραγόντων, που μπορούν να επηρεάσουν τις αιματολογικές παραμέτρους των μηρυκαστικών. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκαν και αξιολογήθηκε η δράση τριών φυσιολογικών παραγόντων, δύο προαναλυτικών (ηλικία, βιταμίνη Β12- λειτουργία μεγάλης κοιλίας) και ενός αναλυτικού (μέθοδος), καθώς και ενός παθολογικού παράγοντα (*Anaplasma phagocytophilum*).

Η διατριβή διαρθρώνεται σε τέσσερα κεφάλαια:

Στο Κεφάλαιο Ι, ανασκοπείται η σχετική βιβλιογραφία που αφορά στους παράγοντες που μεταβάλλουν τις τιμές των αιματολογικών παραμέτρων των μηρυκαστικών. Πιο συγκεκριμένα γίνεται ανάλυση των παραγόντων που επιδρούν πριν, κατά τη διάρκεια ή μετά την ανάλυση των δειγμάτων του αίματος και μπορούν να επηρεάσουν το τελικό αποτέλεσμα των αιματολογικών εξετάσεων. Επιπλέον αναφέρονται οι κυριότεροι παθολογικοί παράγοντες που προκαλούν ποσοτικές και μορφολογικές μεταβολές των κυττάρων του αίματος των μηρυκαστικών. Η κατηγοριοποίησή τους γίνεται με βάση το είδος των κυττάρων που υφίσταται τη σημαντικότερη μεταβολή.

Στο Κεφάλαιο ΙΙ, γίνεται ανασκόπηση της σύνθεσης, του μεταβολισμού, της λειτουργίας, των αναγκών, των επιπτώσεων στη υγεία των μηρυκαστικών τόσο της ανεπάρκειας όσο και της τοξίκωσης από τη βιταμίνη Β12. Στη

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

συνέχεια περιγράφεται η μελέτη της επίδρασης της ηλικίας και της Β12 στις αιματολογικές παραμέτρους των μόσχων. Για τη μελέτη αυτή συλλέχθηκε αίμα από 31 μόσχους πριν και 31 μόσχους μετά τον απογαλακτισμό, φυλής Limousine από την ίδια εκτροφή. Στα ζώα αυτά, πραγματοποιήθηκε γενική εξέταση του αίματος σε αυτόματο αιματολογικό αναλυτή και εκτίμηση του επιχρίσματος του αίματος και προσδιορίσθηκαν οι συγκεντρώσεις της βιταμίνης Β12, των ολικών πρωτεϊνών και των λευκωματινών. Η συγκέντρωση της βιταμίνης Β12 στον ορό του αίματος, ο αιματοκρίτης, η αιμοσφαιρίνη, ο αριθμός των αιμοπεταλιών και των λεμφοκυττάρων ήταν σημαντικά υψηλότερα στους απογαλακτισμένους μόσχους απ' ότι στους μη-απογαλακτισμένους. Πολύ ισχυρή θετική συσχέτιση υπήρξε μεταξύ της συγκέντρωσης της βιταμίνης Β12 και του αιματοκρίτη καθώς και της αιμοσφαιρίνης πριν τον απογαλακτισμό, ενώ αυτές οι συσχετίσεις ήταν μέτρια θετικές μετά τον απογαλακτισμό, όπως και στον ολικό πληθυσμό.

Στο Κεφάλαιο ΙΙΙ περιγράφονται μέθοδοι προσδιορισμού της μάζας κάθε είδους κυττάρων του αίματος στους αυτόματους αιματολογικούς αναλυτές. Στη συνέχεια περιγράφεται η μελέτη σύγκρισης δύο διαφορετικών μεθόδων προσδιορισμού των τιμών των λευκών αιμοσφαιρίων και των αιμοπεταλίων. Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν η σύγκριση των αποτελεσμάτων του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων ύστερα από προσδιορισμό του με μικροσκοπική εξέταση του επιχρίσματος αίματος και με τον αυτόματο αιματολογικό αναλυτή ADVIA 120, καθώς και προσδιορισμός του κατάλληλου διορθωτικού παράγοντα της μεθόδου υπολογισμού του αριθμού των WBCs με τη μικροσκοπική εξέταση του επιχρίσματος. Επιπλέον, σκοπός της μελέτης ήταν και η αξιολόγηση δύο προτεινόμενων παραγόντων για τον υπολογισμό του

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

αριθμού των αιμοπεταλίων στα επιχρίσματα αίματος των προβάτων. Προκειμένου να δημιουργηθεί η εξίσωση παλινδρόμησης μεταξύ του μέσου αριθμού των WBCs ανά πεδίο και του αριθμού των WBCs που προσδιορίζεται από τον ADVIA 120, χρησιμοποιήθηκαν 57 δείγματα αίματος προβάτων. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκαν 31 νέα δείγματα προβάτων για την αξιολόγηση της συμφωνίας μεταξύ του υπολογιζόμενου αριθμού των WBCs βάσει της δημιουργηθείσας εξίσωσης και εκείνων που ελήφθησαν από την ανάλυση. Ομοίως, αξιολογήθηκε η συμφωνία μεταξύ του αριθμού των αιμοπεταλίων με τη χρήση δύο διαφορετικών παραγόντων για τον υπολογισμό του αριθμού των αιμοπεταλίων.

Η απόκλιση ανάμεσα στις τιμές των WBCs που υπολογίστηκαν με τις δύο μεθόδους ήταν 0,4% με αξιοπιστία και ακρίβεια πάνω από 95%. Όσον αφορά στον υπολογισμό του αριθμού των αιμοπεταλίων με τους δύο παράγοντες, η στατιστική απόκλιση ήταν 26,4% και 1,4%, όταν ο αριθμός των αιμοπεταλίων ανά οπτικό πεδίο πολλαπλασιάστηκε με 15.000 και 20.0000, αντίστοιχα.

Στο Κεφάλαιο IV αρχικά, γίνεται σύντομη ανασκόπηση της αναπλάσμωσης που προκαλείται από το βακτήριο *Anaplasma phagocytophilum* στα μηρυκαστικά και ιδιαίτερα της μετάδοσης, της παθογένειας και των μεθόδων που χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση. Η μελέτη που παρουσιάζεται στο κεφάλαιο αυτό είχε σκοπό την αξιολόγηση τυχόν επίδρασης της παρουσίας αντισωμάτων ή αντιγόνου του *A. phagocytophilum* στην ορολογική ή/και στην κυτταρολογική εξέταση, αντίστοιχα και στον αριθμό και τη μορφολογία των κυττάρων του αίματος των προβάτων. Για το σκοπό αυτό συλλέχθηκε αίμα από 138 πρόβατα παρασιτούμενα από κρότωνες. Στα δείγματα αίματος προσδιορίστηκαν οι κύριες αιματολογικές παράμετροι (αιματοκρίτης, αριθμός

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

λευκών αιμοσφαιρίων, λευκοκυτταρικός τύπος, αριθμός αιμοπεταλίων και μορφολογία των κυττάρων) καθώς και η ανίχνευση αντισωμάτων ή αντιγόνου στο αίμα, με τις μεθόδους του έμμεσου ανοσοφθορισμού και της μικροσκοπικής εξέτασης του επιχρίσματος της στοιβάδας των λευκών και των αιμοπεταλίων, αντίστοιχα.

Τα πρόβατα χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες (Α, Β, Γ, Δ) ανάλογα με την παρουσία ή όχι αντισωμάτων ή/και αντιγόνου στο αίμα τους. Τα πρόβατα που βρέθηκαν θετικά μόνο στην παρουσία του αντιγόνου εμφάνισαν ήπια αναιμία, λευκοπενία (κυρίως λεμφοπενία) και θρομβοκυτταροπενία. Τα πρόβατα που ήταν θετικά και στις δύο μεθόδους εμφάνισαν αναιμία, λευκοπενία (ουδετεροπενία και λεμφοπενία) και θρομβοκυτταροπενία. Τα πρόβατα που ήταν θετικά μόνο στην ανίχνευση των αντισωμάτων εμφάνισαν ήπια λευκοπενία. Στις Ομάδες Α και Β παρατηρήθηκαν ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα, ενώ στην τρίτη ομάδα μόνο λίγα ενεργοποιημένα μονοκύτταρα. Στην Ομάδα Β διαπιστώθηκε μεγαλύτερος αριθμός άωρων ουδετεροφίλων και η παρουσία ενός τοξικού ουδετερόφιλου στο επίχρισμα του αίματος.

Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από τα ευρήματα αυτής της διατριβής, είναι τα εξής:

- Η παρατηρούμενη διακύμανση των αιματολογικών παραμέτρων με την ηλικία φαίνεται να σχετίζεται με τη συγκέντρωση της βιταμίνης Β12.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

Επιπλέον, η βιταμίνη Β12 είναι υψηλότερη στους απογαλακτισμένους μόσχους, στους οποίους γίνεται σύνθεση της βιταμίνης Β12 στη μεγάλη κοιλία σε σύγκριση με τους μη-απογαλακτισμένους μόσχους οι οποίοι προσλαμβάνουν εξωγενώς τη βιταμίνης Β12, κυρίως με το γάλα.

- Ο προσδιορισμός των λευκών αιμοσφαιρίων στο αίμα των προβάτων με τη μικροσκοπική μέθοδο είναι μια αξιόπιστη εναλλακτική λύση της χρήσης των αυτοματοποιημένων αιματολογικών αναλυτών χρησιμοποιώντας τη δημιουργηθείσα εξίσωση. Ο πολλαπλασιασμός του αριθμού των αιμοπεταλίων ανά πεδίο με τον παράγοντα 20.000 υπερτερεί σε σχέση με τον παράγοντα 15.000, για τον προσδιορισμό των αιμοπεταλίων.

- Η μόλυνση ή/και η έκθεση των προβάτων στο *A. phagocytophilum* συνοδεύεται από ποσοτικές μεταβολές όλων των κυττάρων του αίματος, αλλά και μεταβολές στη μορφολογία των λευκών αιμοσφαιρίων. Τα αποτελέσματα των αιματολογικών εξετάσεων σε συνδυασμό με τις κυτταρολογικές και ορολογικές εξετάσεις για την ανίχνευση του μικροοργανισμού ή των αντισωμάτων, αντίστοιχα, μπορούν να συμβάλλουν στην εκτίμηση του σταδίου του νοσήματος. Από κλινικής άποψης, η μειωμένη κυτταρική ανοσία (λευκοπενία) που διαπιστώθηκε στο διάστημα που εντοπίζονται ταυτόχρονα ο μικροοργανισμός και τα αντισώματα, δείχνει ότι την περίοδο αυτή τα ζώα είναι πιο ευάλωτα και συνεπώς χρειάζεται παρακολούθηση για την έγκαιρη αντιμετώπιση δευτερογενών επιπλοκών. Επίσης, ο συνδυασμός λευκοπενίας και

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

θρομβοκυτταροπενίας είναι το σημαντικότερο εργαστηριακό εύρημα που θέτει υποψία της νόσου.

Οι μεταβολές που διαπιστώθηκαν είναι ενδεικτικές φλεγμονώδους αντίδρασης, αντιγονικής διέγερσης και καταπόνησης. Τα ευρήματα αυτά προσθέτουν στη γνώση των παθογενετικών μηχανισμών της αναπλάσμωσης των προβάτων και αναδεικνύουν την αξία της γενικής εξέτασης του αίματος και της αξιολόγησης της μορφολογίας των κυττάρων στην παρακολούθηση της εξέλιξης του νοσήματος.

Δημοσιεύσεις σχετιζόμενες με την παρούσα διατριβή

Στις παρακάτω επιστημονικές δημοσιεύσεις παρουσιάζονται τμήματα της παρούσας διατριβής:

I. Katsogiannou E.G, Athanasiou L.V., Christodoulopoulos G., Polizopoulou Z.S., 2018. Diagnostic approach of anemia in ruminants. J Hell Vet Med Soc 69, 1033-1046

II. Katsogiannou E.G, Athanasiou L.V., Katsoulos P.D., Polizopoulou Z.S., Tzivara A., Christodoulopoulos G., 2020. Estimation of white blood cell and platelet counts in ovine blood smears and comparison with the ADVIA 120 hematology analyzer. Vet Clin Path 49, 222-226

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

SUMMARY

This thesis aimed to assess the effect of physiological factors that act before or during the complete blood count analysis, as well as pathological factors which can affect the hematological variables of ruminants. Among these factors, three physiological, two pre-analyticals (age, B12-rumen function) and one analytical (method), as well as one pathological factor (*Anaplasma phagocytophilum*), were selected and assessed.

The thesis is divided into four chapters.

In Chapter I, the literature regarding the factors having an impact on the values of the hematological variables of ruminants are thoroughly reviewed. More specifically, factors acting at the pre-analytical, analytical or post-analytical phase and could alter the results of hematological variables are reported. In addition, the main pathological factors that affect blood cell counts and morphology of ruminants and the changes that are observed are presented. Their classification is based on the type of cells that undergo the most significant changes.

In Chapter II, B12 synthesis, metabolism, function, requirements and the effect of B12 deficiency or toxicosis on ruminant health, are briefly reported. The study presented in this chapter regards the comparison of the concentrations of vitamin B12 and the values of hematological variables before and after weaning in veal calves and the investigation of the correlation between the concentration of vitamin B12 in blood and the hematological

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

variables in calves before and after weaning. To this aim, blood was collected form 31 pre-weaned and 31 weaned calves of Limousine breed from the same farm. Complete blood count was performed in automated hematological analyzer and by blood smear evaluation and serum B12, total protein and albumin concentrations were measured. The serum concentration of vitamin B12, the HCT, the HGB, the platelet count and the lymphocyte count were significantly higher in weaned compared to pre-weaned calves. A very strong positive correlation was found between the concentration of vitamin B12 and HCT and HGB before weaning while these correlations were moderate positive after weaning and in the total population tested as well.

In Chapter III, methods for the determination of the complete blood cell count in automatic hematological analyzers are described. Subsequently, the comparative study on WBC and platelet count determination is reported. The aim of this study was the comparison of the results of the WBC count evaluated microscopically in blood smears with those obtained by ADVIA 120 hematology analyzer and the validation of the appropriate correction factors for the manual technique, as well as the assessment of two suggested factors for platelet calculation in blood smears in sheep. In order to generate the regression equation between the average WBC count per field and the WBC count determined by ADVIA 120, 57 ovine blood samples were used. Then, 31 new ovine samples were used for the assessment of the agreement between the calculated WBC count based on the generated equation and those obtained by the analyzer. Similarly, agreement between platelet count using two different factors for platelet calculation was assessed. Average bias

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

of calculated WBC count was 0.4% with precision and accuracy over 95%. Regarding calculated platelet count a bias of 26.4% and 1.4% was revealed when the average number of platelets per field was multiplied by 15,000 and 20,000 respectively.

In Chapter IV, at first, the infection and/or the disease caused by the *Anaplasma phagocytophilum* in ruminants including transmission, pathogenesis and diagnosis are briefly reviewed. The study presented in this chapter concerns the investigation of the effect of the presence of antibodies or the antigen of *A. phagocytophilum* on serological, and/or cytological examination, respectively, on the blood cell count and morphology in sheep. To this aim 138 sheep with tick infestation were blood sampled for the determination of the main hematological variables (PCV, WBC and differential WBC count, PLT count and blood cell morphology) as well as for the detection of the presence of antibodies and/or antigen in their blood, employing an indirect immunofluorescent assay and buffy coat blood smear microscopy, respectively.

The sheep were divided into four groups (A, B, C, D) depending on the presence or absence of antibodies or/and antigen in their blood. Sheep found positive only in the presence of the antigen showed mild anemia, leukopenia (mainly lymphopenia) and thrombocytopenia. Positive sheep in both methods showed anemia, leukopenia (neutropenia and lymphopenia) and thrombocytopenia. Sheep that were positive only for antibody detection showed mild leukopenia. In the Groups A and B, activated lymphocytes and

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

monocytes were observed, while in Group C only a few activated monocytes were observed. In Group B a higher number of band neutrophils was found and a toxic neutrophil in the blood smear was present.

The findings of this thesis are the followings:

- The observed variation in the hematological variables with age seems to be related with vitamin B12 concentration. Moreover, vitamin B12 is higher in weaned calves that vitamin B12 is synthesized in rumen compared to pre-weaned calves that depend on the intake of vitamin B12 from external sources, mainly milk.

- Microscopic counting of WBCs in ovine blood is a reliable alternative to automated analysis using the generated equation. A better agreement between the two methods was observed when the factor 20,000 was used for the calculation of platelet count in ovine blood smear.

- Infection or/and exposure of sheep to *A. phagocytophilum* is accompanied by quantitative changes in all blood cells, as well as changes in the morphology of white blood cells. In this study, quantitative changes in all blood cells were found, as well as changes in the morphology of white blood cells. The results of the complete blood count in combination with the cytological and serological tests for the detection of the microorganism or the antibodies, respectively, can contribute to the assessment of the stage of the disease. From a clinical point of view, the compromised cellular immunity, found during the simultaneous detection of microorganisms and antibodies, shows that during this period the animals are more susceptible and therefore

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248

need to be monitored for early treatment of secondary complications. Also, the combination of leukopenia and thrombocytopenia is the most important laboratory finding that raises the suspicion of the disease.

The changes found are indicative of an inflammatory reaction, antigenic stimulation, and stress. These findings add to the knowledge of the pathogenetic mechanisms of *A. phagocytophilum* infection in sheep and highlight the value of the complete blood cell count and the evaluation of cell morphology in monitoring disease progression.

Publications associated with the present thesis

The following scientific paper presenting facets of the present thesis, is available:

I. Katsogiannou E.G, Athanasiou L.V., Christodoulopoulos G., Polizopoulou Z.S., 2018. Diagnostic approach of anemia in ruminants. J Hell Vet Med Soc 69, 1033-1046

II. Katsogiannou E.G, Athanasiou L.V., Katsoulos P.D., Polizopoulou Z.S., Tzivara A., Christodoulopoulos G., 2020. Estimation of white blood cell and platelet counts in ovine blood smears and comparison with the ADVIA 120 hematology analyzer. Vet Clin Path 49, 222-226

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:44:23 EEST - 3.135.197.248