



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ & ΕΙΔΙΚΗΣ ΖΩΟΤΕΧΝΙΑΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ
& ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Επίδραση του εμπλουτισμού του σιτηρεσίου των προβατινών
με ένα μίγμα φυτικών βιοενεργών συστατικών επί του αριθμού
και της σύστασης των σωματικών κυττάρων του πρόβειου γάλακτος

Μαρία Α. Τσάφου

Επιβλέπων καθηγητής:

Παναγιώτης Σιμιτζής, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ 2023

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ & ΕΙΔΙΚΗΣ ΖΩΟΤΕΧΝΙΑΣ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Επίδραση του εμπλουτισμού του σιτηρεσίου των προβατινών με ένα μίγμα φυτικών βιοενεργών συστατικών επί του αριθμού και της σύστασης των σωματικών κυττάρων του πρόβειου γάλακτος

Effect of enrichment of ewe rations with a mixture of plant bioactive compounds on the number and composition of somatic cells in sheep's" milk

Μαρία Λ. Τσάφου

Εξεταστική Επιτροπή:

Παναγιώτης Σιμιτζής, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Μαρία Χαρισμιάδου, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ

Αθανάσιος Γελασάκης, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Επίδραση του εμπλουτισμού του σιτηρεσίου των προβατινών με ένα μίγμα φυτικών βιοενεργών συστατικών επί του αριθμού και της σύστασης των σωματικών κυττάρων του πρόβειου γάλακτος

*ΔΠΜΣ Ολοκληρωμένη Διαχείριση Παραγωγής Γάλακτος & Γαλακτοκομικών Προϊόντων
Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Γενικής & Ειδικής Ζωοτεχνίας*

Περίληψη

Η ενσωμάτωση των πρόσθετων υλών στη διατροφή των ζώων τα τελευταία χρόνια έχει αποδειχτεί ότι έχει ποικίλα οφέλη στην υγεία αυτών και κατά συνέπεια στις αποδόσεις και το οικονομικό όφελος των εκτροφών/επιχειρήσεων. Πιο συγκεκριμένα, μετά την απαγόρευση της χρήσης των αντιβιοτικών στη διατροφή των ζώων, τα οποία χρησιμοποιούνταν κατά κόρον είτε ως αυξητικοί παράγοντες είτε για τη θεραπεία παθήσεων του μαστού όπως της μαστίτιδας, τα προβιοτικά, τα πρεβιοτικά, τα συμβιωτικά και τα φυτοβιοτικά άρχισαν να ενσωματώνονται στα σιτηρέσια των ζώων. Η παρατεταμένη χρήση των αντιβιοτικών φάνηκε να έχει αρνητικές επιπτώσεις οι οποίες σχετίζονταν με την ανάπτυξη της μικροβιακής αντοχής επικίνδυνων παθογόνων, γεγονός που θα μπορούσε να επιφέρει ολέθριες συνέπειες για την υγεία των ανθρώπων. Οι πρόσθετες ύλες και πιο συγκεκριμένα τα φυτοβιοτικά, αντιθέτως, όπως έχει αποδειχτεί, διαθέτουν σημαντικές ευεργετικές ιδιότητες χωρίς να επηρεάζουν αρνητικά τόσο την υγεία των ζώων όσο και των καταναλωτών. Βάσει ερευνών και πειραμάτων που έχουν πραγματοποιηθεί έχει αποδειχθεί ότι τα φυτοβιοτικά διαθέτουν μια πληθώρα από αντιμικροβιακές, αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Αναφορικά, η ικανότητά τους να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες συμβάλλει στην πρόληψη ασθενειών όπως ο καρκίνος.

Παράλληλα η χρήση αυτών στα σιτηρέσια των ζώων έχει αποδειχτεί ότι βελτιώνει την πεπτικότητα της τροφής συμβάλλοντας έτσι στην καλύτερη αξιοποίηση των θρεπτικών συστατικών και συνεπώς στην βελτίωση της ανάπτυξης των ζώων. Επιπλέον, τα φυτοβιοτικά, προστιθέμενα στα σιτηρέσια των ζώων, διεγείρουν την όρεξη αυξάνοντας την ημερήσια πρόσληψη τροφής και συνεπώς οδηγούν σε υψηλότερη μετατρεψιμότητα της τροφής. Αξίζει να αναφερθεί ότι σημαντική είναι η επίδραση αυτών στην αύξηση της γαλακτοπαραγωγής, καθώς επίσης και στην πρόληψη και θεραπεία της μαστίτιδας κυρίως λόγω της δράσης αυτών έναντι στα πιο συνήθη παθογόνα που είναι υπεύθυνα για την πρόκληση αυτής.

Στην παρούσα πτυχιακή μελέτη διερευνήθηκε η επίδραση της χορήγησης ενός Μίγματος Φυτικών Βιοενεργών συστατικών (ΜΦΒ) στο σιτηρέσιο προβατινών στην υγιεινή κατάσταση του μαστού, όπως αυτή αξιολογήθηκε με βάση τον αριθμό και το είδος των σωματικών κυττάρων σε δείγματα παραγόμενου γάλακτος. Για την ανίχνευση των κυττάρων αυτών εφαρμόστηκε η μέθοδος της κυτταρομετρίας ροής (Flow Cytometry - FC) με τη βοήθεια του κυτταρομετρητή ροής του εργαστηρίου Γενικής και Ειδικής Ζωοτεχνίας. Για την πραγματοποίηση του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 36 προβατίνες, περίπου 100 ημέρες μετά τον τοκετό, οι οποίες είχαν κατανεμηθεί τυχαία σε 3 πειραματικές επεμβάσεις, στις οποίες χορηγήθηκαν 3 σιτηρέσια. Στο πρώτο σιτηρέσιο δεν είχε προστεθεί το μίγμα ΜΦΒ - μάρτυρας (C), το δεύτερο σιτηρέσιο ήταν εμπλουτισμένο με ΜΦΒ (B1) και το τρίτο σιτηρέσιο εμπλουτισμένο με προστατευμένο

ΜΦΒ (B2) στα επίπεδα των 0,5%. Η διάρκεια του πειράματος ήταν 12 εβδομάδες και σε εβδομαδιαία βάση, καταγραφόταν η γαλακτοπαραγωγή, ενώ συλλέγονταν ατομικά δείγματα γάλακτος για τον προσδιορισμό της σύστασης, της οξειδωτικής σταθερότητας, του pH, του αριθμού των σωματικών κυττάρων (SCC) και της ακριβούς αναλογίας τους. Ο αριθμός των σωματικών κυττάρων (log SCC) ήταν μειωμένος στην ομάδα B2, χωρίς όμως να επηρεαστεί η αναλογία των ανοσιακών κυτταρικών τύπων. Συμπερασματικά, όπως αποδείχτηκε μέσω της μελέτης αυτής, η προσθήκη του ΜΦΒ έχει θετική επίδραση στην υγεία του μαστού.

Επιστημονική περιοχή: Φυτοβιοτικά

Λέξεις κλειδιά: Πρόσθετες ύλες, μαστίτιδα, σωματικά κύτταρα, κυτταρομετρία ροής

Effect of enrichment of ewe rations with a mixture of plant bioactive compounds on the number and composition of somatic cells in sheep's milk

Msc Integrated Production Management of Milk & Dairy Products

Department of Animal Science

Department of Food Science & Human Nutrition

Laboratory of Animal Breeding & Husbandry

Abstract

In recent years, the use of feed additives in animal nutrition has been proven to have various benefits both in their health and performance and therefore in the economic benefits of the breeders. More specifically, with the prohibition of antibiotics in animal nutrition, which were often used either as growth factors or to treat udder diseases, such as mastitis, probiotics, prebiotics, symbiotics and phytobiotics began to be incorporated into animal diets. The prolonged use of antibiotics has been shown to cause antimicrobial resistance against dangerous pathogens that could have devastating consequences for human health. On the contrary, feed additives and particularly phytobiotics, have been proven to extremely beneficiate animal and human health. In addition, studies have shown that phytobiotics can possess antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant properties. More precisely, their ability to bind free radicals helps prevent many diseases such as cancer. At the same time, the inclusion of phytobiotics in animal diets improves the digestibility of feed, thus contributing to the better utilization of nutrients and therefore to the improvement of animal growth. Moreover, phytobiotics stimulate appetite by increasing the daily feed intake and thus leading to a higher feed conversion rate (FCR). Furthermore, they seem to have a great effect on increasing milk production. Among their properties, phytobiotics have been proven to prevent and treat mastitis, mainly acting against the most common pathogens responsible for its outbreak. In the present study, it was investigated the effect of the inclusion of a phytobiotic mixture in sheep feed/diets, on the health status of the udder based on the evaluation of the number and the type of somatic cells in the milk samples. In order to achieve this, Flow Cytometry method (FC) was applied, on Flow Cytometer 500 instrument of the Laboratory of Animal Breeding and Husbandry of the Department of Animal Science of the Agricultural University of Athens. In order to carry out this experiment, 36 ewes were used, approximately 100 days after calving, which had been randomly allocated to 3 experimental interventions, in which 3 rations were administrated. In the first ration no MPBC was added- control mixture (C), the second ration was enriched with MPBC (B1) and the third ration was enriched with protected MPBC (B2) at the levels of 0.5%. The duration of the experiment was 12 weeks and milk production was recorded on a weekly basis, while individual milk samples were collected to determine the composition, oxidative stability, pH, number of somatic cells and their exact ratio. The number of somatic cells (log SCC) was reduced in the B2 group, but the proportion of immune cell types was not affected. In conclusion, as demonstrated through this study, the addition of PBI mixture has a positive effect on udder health.

Scientific area: Phytobiotics

Key words: Feed additives; mastitis; somatic cells; flow cytometry

Δήλωση έργου

Η κάτωθι υπογεγραμμένη, Μαρία Τσάφου δηλώνω ότι το κείμενο της μελέτης αποτελεί δικό μου, μη υποβοηθούμενο πόνημα. Υποβάλλεται σε μερική εκπλήρωση των απαιτήσεων για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στην (Ολοκληρωμένη Διαχείριση Παραγωγής Γάλακτος και Γαλακτοκομικών Προϊόντων) του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Δεν έχει υποβληθεί ποτέ πριν για οιοδήποτε λόγο ή για εξέταση σε οποιοδήποτε άλλο πανεπιστήμιο ή εκπαιδευτικό ίδρυμα της χώρας ή του εξωτερικού.

Μαρία Τσάφου

Μάρτιος 2023

Ευχαριστίες

Για την εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα μου, Αναπληρωτή Καθηγητή του Εργαστηρίου Γενικής και Ειδικής Ζωοτεχνίας κ. Σιμιτζή Παναγιώτη για την εμπιστοσύνη που επέδειξε απέναντι μου καθώς επίσης και την καθοδήγηση και κατανόησή του καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Χαρισμιάδου Μαρία για τις πολύτιμες γνώσεις που μου μετέφερε καθ' όλη τη διάρκεια των προπτυχιακών και μεταπτυχιακών μου σπουδών καθώς επίσης και για τις συμβουλές της αναφορικά με την παρούσα πτυχιακή μελέτη. Επιπροσθέτως, ευχαριστίες αξίζουν και στον Επίκουρο Καθηγητή κ. Γελασάκη Αθανάσιο, ο οποίος παραχώρησε τη συσκευή Lactoscan Combo, η οποία ήταν απαραίτητη για την πραγματοποίηση του ενός μέρους του πειράματος, που αφορούσε στην εκτίμηση της σύστασης του γάλακτος αλλά και για τις παρατηρήσεις του με σκοπό τη βελτίωση αυτής της μελέτης.

Επίσης, ιδιαίτερες ευχαριστίες αξίζουν στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Χάγερ Αριάδνη για την παραχώρηση του Κυτταρομετρητή Ροής FC500 προκειμένου να πραγματοποιηθεί η εκτίμηση του αριθμού και του είδους των σωματικών κυττάρων, όπως επίσης και στην υποψήφια διδάκτορα, Πολίτη Αικατερίνη, η οποία συνέβαλε καθοριστικά στη κατανόηση της λειτουργίας καθώς και τον χειρισμό του οργάνου.

Ακόμη, ιδιαίτερη μνεία αξίζει στους συναδέλφους και φίλους, υποψήφιους διδάκτορες, Ζαντιώτη Χριστίνα και Μπρουκλόγιαννη Ιωάννη, καθώς εκτός της στήριξής τους, οι συμβουλές και οι παρατηρήσεις τους συντέλεσαν στη βελτίωση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την υποστήριξη τόσο ηθική αλλά και οικονομική στην προσπάθειά μου να πραγματοποιήσω τους στόχους μου.

Τέλος, θα ήθελα από καρδιάς να ευχαριστήσω τους φίλους και συνοδοιπόρους μου στη ζωή που χωρίς αυτούς τίποτα δεν θα ήταν το ίδιο εύκολο και ευχάριστο.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	3
Abstract	5
Ευχαριστίες	7
Κατάλογος Πινάκων.....	10
Κατάλογος Εικόνων	11
1. Εισαγωγή.....	12
1.1 Προβατοτροφία	12
1.2 Κριτήρια ταξινόμησης των φυλών προβάτων και οι σημαντικότερες φυλές.....	17
1.3 Η προβατοτροφία στον Ελλαδικό χώρο	18
1.4 Γαλακτοπαραγωγή	21
1.5 Αξιοποίηση του πρόβειου γάλακτος.....	21
1.6 Διατροφή των προβάτων	22
2. Παθήσεις του μαστού	24
2.1 Η μαστίτιδα.....	25
2.2 Διάκριση των τύπων μαστίτιδας	25
2.3 Πιθανοί παράγοντες που μπορεί να οδηγήσουν στην εμφάνιση μαστίτιδας	27
2.4 Παθολογικοί παράγοντες που μπορεί να οδηγήσουν στην εμφάνιση μαστίτιδας.....	31
3. Αριθμός σωματικών κυττάρων.....	33
3.1 Μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την αύξηση του αριθμού των σωματικών κυττάρων κατά τη μόλυνση του μαστού	33
3.2 Ο ρόλος των κυρίαρχων τύπων κυττάρων στο γάλα των μηρυκαστικών κατά την εμφάνιση της φλεγμονής	34
3.3 Εισβολή των βακτηρίων στον μαστό και εγκατάσταση της μόλυνσης	42
4. Προσδιορισμός τους είδους των σωματικών κυττάρων - Λίγα λόγια για την κυτταρομετρία ροής.....	44
4.1 Πλεονεκτήματα της μεθόδου	45
4.2 Ιστορική αναδρομή.....	45
4.3 Τα μέρη του οργάνου	46
5. Τα αντιβιοτικά ως αυξητικοί παράγοντες.....	48
5.1 Οι πρόσθετες ύλες έναντι των αντιβιοτικών	48
6. Γενικά για τα φυτοβιοτικά.....	50
6.1 Η χημική σύσταση και ο τρόπος δράσης των φυτοβιοτικών	51
6.2 Αντιμικροβιακή δράση των φυτοβιοτικών	53
6.3 Τα αιθέρια έλαια	55
6.4 Αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση των φυτοβιοτικών	55
6.5 Επίδραση των φυτοβιοτικών στην πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών.....	56
6.6 Επίδραση των φυτοβιοτικών στην ανάπτυξη των μηρυκαστικών	57

6.7 Επίδραση των φυτοβιοτικών στη γαλακτοπαραγωγή.....	58
6.8 Επίδραση των φυτοβιοτικών στην πρόληψη και αντιμετώπιση της μαστίτιδας	59
7. Πειραματικό μέρος.....	60
7.1 Διατροφή.....	61
7.2 Κυτταρομετρητής ροής.....	61
7.3 Πρωτόκολλο απομόνωσης σωματικών κυττάρων από πρόβειο νωπό γάλα	61
7.4 Τρόπος λειτουργίας του Κυτταρομέτρου Ροής FC500.....	64
8. Αποτελέσματα.....	66
9. Σχολιασμός των αποτελεσμάτων.....	69
10. Συμπεράσματα.....	75
Βιβλιογραφία.....	77

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1.1. Παγκόσμια κατανομή του πληθυσμού των αιγοπροβάτων.....	14
Πίνακας 6.1. Τα πιο κοινώς χρησιμοποιούμενα φυτοβιοτικά.....	51
Πίνακας 6.2. Η επίδραση βασικών φυτοβιοτικών στην ανοσολογική απόκριση παραγωγικών ζώων	54
Πίνακας 7.1. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή της χρώσης Χ..	63
Πίνακας 7.2. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή της χρώσης Υ..	63
Πίνακας 8.1. Ο μέσος όρος των σωματικών κυττάρων του γάλακτος των ζώων ανάλογα με το σιτηρέσιο που χορηγούνταν (CONTROL, GROUP A, GROUP B...)	66
Πίνακας 8.2. Ο λογαριθμικός αριθμός των σωματικών κυττάρων του γάλακτος των ζώων ανάλογα με το σιτηρέσιο που τους χορηγούνταν (CONTROL, GROUP A, GROUP B)	67
Πίνακας 8.3. Ο μέσος όρος των λεμφοκυττάρων του γάλακτος των ζώων ανάλογα με το σιτηρέσιο που τους χορηγούνταν (CONTROL, GROUP A, GROUP B)	67
Πίνακας 8.4. Ο μέσος όρος των μακροφάγων του γάλακτος των ζώων ανάλογα με το σιτηρέσιο που τους χορηγούνταν (CONTROL, GROUP A, GROUP B)	68
Πίνακας 8.5. Ο μέσος όρος των πολυμορφοπύρηνων του γάλακτος των ζώων ανάλογα με το σιτηρέσιο που τους χορηγούνταν (CONTROL, GROUP A, GROUP B)	68

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1.1. Παραγωγή κρέατος στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης σε τόνους το έτος 2019.....	15
Εικόνα 1.2. Παραγωγή γάλακτος στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης σε τόνους το έτος 2019.....	15
Εικόνα 1.3. Παγκόσμια παραγωγή κρέατος σε τόνους το έτος 2019.....	16
Εικόνα 1.4. Παγκόσμια παραγωγή γάλακτος σε τόνους το έτος 2019.....	16
Εικόνα 1.5. Αριθμός εκτρεφόμενων προβάτων σε Ελλάδα τα έτη 1961-2019.....	19
Εικόνα 1.6. Παραγόμενη ποσότητα πρόβειου κρέατος στην Ελλάδα τα έτη 1961-2019	20
Εικόνα 1.7. Παραγόμενη ποσότητα πρόβειου γάλακτος στην Ελλάδα τα έτη 1961-2019	20
Εικόνα 2.1. Εικόνα μαστού αίγας με γαγγραινώδη μαστίτιδα.....	26
Εικόνα 2.2. Μερικά παραδείγματα γραμμικών βαθμολογιών μορφολογίας μαστού και θηλής	29
Εικόνα 3.1. Τρισδιάστατη απεικόνιση του μακροφάγου.....	39
Εικόνα 3.2. Τρισδιάστατη απεικόνιση του ουδετερόφιλου.....	41
Εικόνα 3.3. Η διαδικασία της φαγοκυττάρωσης των παθογόνων.....	41
Εικόνα 3.4. Είσοδος του μικροβίου στον μαστό και πρόκληση της μόλυνσης.....	43

1. Εισαγωγή

1.1 Προβατοτροφία

Τα πρόβατα που εκτρέφονται στις μέρες μας ανήκουν στο υποείδος *Ovis ammon aries*. Το γένος *Ovis* υπάγεται στη φυλή *Caprini*, στην υπο-οικογένεια *Caprinae*, στην οικογένεια *Bovidae*, στην υπο-υπόταξη *Pecora*, στην υπόταξη *Ruminantia* και στην τάξη *Artiodactyla*. Στο γένος *Ovis* περιλαμβάνονται τα εξής είδη: το είδος *Ovis orientalis* (mouflon) με 2 υποείδη, το είδος *Ovis ammon*, με 9 υποείδη, το είδος *Ovis canadensis* με 4 υποείδη, το είδος *Ovis nivicola* με 3 υποείδη και το είδος *Ovis dalli* με 3 υποείδη (Ζυγογιάννης, 2014). Το πρόβατο (*Ovis ammon forma aries*) είναι το πρώτο αγροτικό ζώο που κατοικιδιοποίησε ο άνθρωπος. Λόγω, της ιδιότητάς του ως μηρυκαστικό, να εκμεταλλεύεται την πτωχή κατά περιόδους βλάστηση, του σχετικά μικρού του σωματικού μεγέθους, του εντόνως ανεπτυγμένου κοινωνικού του ενστίκτου και της μεγάλης ποικιλίας των προϊόντων που παράγει, διαδόθηκε σταδιακά από τα αρχικά κέντρα κατοικιδιοποίησης σχεδόν σε ολόκληρη τη γη και διαδραμάτισε σημαντικό ρόλο για την επιβίωση, την ευημερία και την ανάπτυξη πολλών λαών. Το δέρμα του προβάτου βοήθησε τον άνθρωπο να κατακτήσει τα ψυχρά κλίματα ενώ το μαλλί του εξακολουθεί έως σήμερα να αποτελεί τη σπουδαιότερη κλωστοϋφαντουργική ίνα ζωικής προέλευσης. Πιο συγκεκριμένα, το μαλλί των Μερινόμαλλων προβάτων και των συγγενών φυλών, παρέχει σπουδαία ύλη για την παραγωγή πολυτελών ενδυμάτων. Επιπλέον, το πρόβατο Καρακούλ προσφέρει στον άνθρωπο αμνοδέρματα για την κατασκευή αισθητικών γουνών, ενώ από την άλλη αναμεικτόμαλλα πρόβατα εκτρέφονται σε πολλές περιοχές της γης των οποίων το μαλλί βρίσκει χρήση στην ταπητουργία. Η παγκόσμια παραγωγή καθαρού μαλλιού ανέρχεται σε περίπου 2.470 χιλιάδες τόνους. Ακόμη, το πρόβειο κρέας, αποτελεί εδώ και πολλές χιλιετίες σπουδαία πηγή προμήθειας του ανθρώπου με ζωική πρωτεΐνη. Στις μέρες μας, με μεγάλες διαφορές από χώρα σε χώρα, περίπου το 4% της καταναλισκόμενης ποσότητας κρέατος προέρχεται από την προβατοτροφία. Το πρόβειο κρέας είναι το μόνο κρέας θηλαστικών του οποίου η κατανάλωση δεν περιορίζεται από θρησκευτικές και άλλες προκαταλήψεις, όπως συμβαίνει με το βοδινό και το χοιρινό κρέας. Επιπροσθέτως, το πρόβειο γάλα ξεχωρίζει για την ιδιαίτερα υψηλή του θρεπτική αξία καθώς επίσης και την καταλληλότητά του για την παρασκευή τυροκομικών προϊόντων (Ρογδάκης, 2002). Σύμφωνα με πρόσφατα στοιχεία, η παγκόσμια παραγωγή

πρόβειου κρέατος το 2019 ανερχόταν στους 10.000.000 εκατομμύρια τόνους ενώ η παραγωγή γάλακτος σε παγκόσμιο επίπεδο ανέρχεται σε περίπου 10.500.000 εκατομμύρια τόνους (FAO, 2021). Σύμφωνα, με πρόσφατα δεδομένα συνολικός αριθμός των εκτρεφόμενων προβάτων στην Ελλάδα ανέρχεται σε περίπου 8,4 εκατομμύρια άτομα κατανεμημένα σε 84.000 εκμεταλλεύσεις (Σιμιτζής, 2021). Η κατανομή των προβάτων στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης φαίνεται στον Πίνακα 1, ενώ στη συνέχεια ακολουθούν ενδεικτικές Εικόνες (1.1, 1.2, 1.3 και 1.4), που αποδίδουν την κατάταξη της χώρας μας σε σχέση με τις υπόλοιπες Ευρωπαϊκές χώρες όσον αφορά στην παραγωγή πρόβειου κρέατος και γάλακτος.

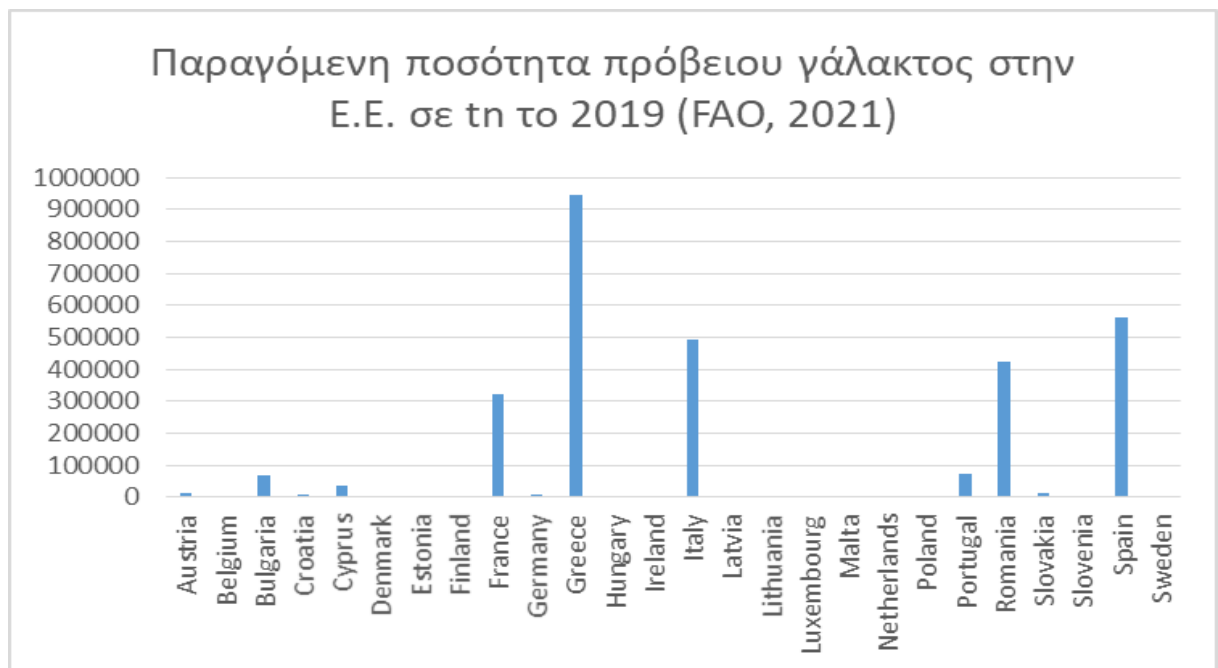
Πίνακας 1.1. Παγκόσμια κατανομή του πληθυσμού των αιγοπροβάτων.

ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΡΟΒΑΤΩΝ ΣΤΗΝ Ε.Ε. (EUROSTAT, FAO)

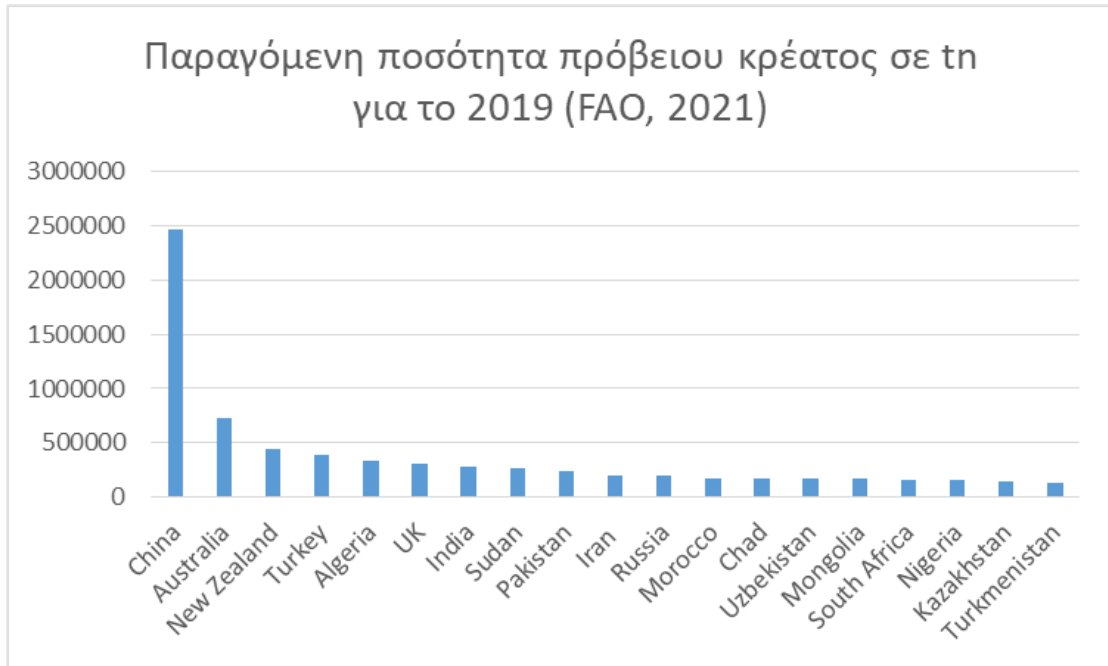
ΧΩΡΑ	ΠΡΟΒΑΤΑ (ΧΙΛ.)	ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ (ΧΙΛ.)	ΠΡΟΒΑΤΑ ΑΝΑ 1000 ΚΑΤΟΙΚΟΥΣ	ΠΡΟΒΑΤΑ ΑΝΑ 1000 ΣΤΡΕΜ. ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΕΚΤΑΣΗΣ
Βέλγιο	147	10446	14	11
Δανία	141	5411	26	5
Γερμανία	2560	82501	31	15
Ελλάδα	9241	11073	835	233
Ισπανία	222932	43038	533	91
Γαλλία	8898	62371	143	32
Ιρλανδία	4557	4109	1109	104
Ιταλία	8106	58462	139	62
Λουξεμβούργο	7	455	15	5
Ολλανδία	1450	16306	89	72
Αυστρία	327	8207	40	10
Πορτογαλία	3541	10529	336	95
Φινλανδία	72	5237	14	3
Σουηδία	456	9011	51	15
Μεγ. Βρετανία	24688	60063	411	153
Τσεχία	155	10221	15	4
Εσθονία	42	1347	31	5
Κύπρος	260	749	347	167
Λετονία	39	2306	17	3
Λιθουανία	22	3425	6	1
Ουγγαρία	1397	10098	138	32
Μάλτα	14	403	35	127
Πολωνία	311	38174	8	2
Σλοβενία	119	1998	60	24
Σλοβακία	321	5385	60	15
Βουλγαρία	1599	7320	218	29
Ρουμανία	7447	22440	332	50
Ε.Ε. (27)	98849	491934	201	56



Εικόνα.1.1 Παραγωγή κρέατος στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης σε τόνους το έτος 2019 (FAO, 2021).



Εικόνα 1.2. Παραγωγή γάλακτος στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης σε τόνους το έτος 2019 (FAO, 2021).



Εικόνα 1.3. Παγκόσμια παραγωγή κρέατος σε τόνους το έτος 2019 (FAO, 2021).



Εικόνα 1.4. Παγκόσμια παραγωγή γάλακτος σε τόνους το έτος 2019 (FAO, 2021).

1.2 Κριτήρια ταξινόμησης των φυλών προβάτων και οι σημαντικότερες φυλές

Η ταξινόμηση των φυλών προβάτων γίνεται με βάση τον τύπο του αποδιδόμενου μαλλιού, το μήκος και τη διάπλαση της ουράς καθώς επίσης και την παραγωγική τους κατεύθυνση. Με βάση τον τύπο του μαλλιού τα ζώα ταξινομούνται σε τριχοπρόβατα, αναμικόμαλλα, ομοιόμαλλα και μερινόμαλλα. Με βάση το μήκος και τη διάπλαση της ουράς ταξινομούνται σε μακρoura, βραχύoura και παχύoura ενώ με βάση την παραγωγική τους κατεύθυνση σε κρεοπαραγωγές, γαλακτοπαραγωγές, εριοπαραγωγές και κρεοπαραγωγές-εριοπαραγωγές φυλές. Αν και οι κύριες φυλές προβάτων με βάση την παραγωγική κατεύθυνση είναι οι κρεοπαραγωγές (-εριοπαραγωγές) στην Ελλάδα απαντάται αποκλειστικά και μόνο ο γαλακτοπαραγωγικός τύπος.

Οι φυλές γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης κυριαρχούν τόσο στη χώρα μας όσο και σε χώρες της Μεσογείου, εντούτοις γαλακτοπαραγωγές φυλές όπως η Ανατολικής Φριςλανδίας, η Lacaune και η βελτιωμένη Awassi διαθέτουν διεθνή φήμη. Αξίζει να αναφερθεί πως η φυλή Ανατολικής Φριςλανδίας αποτελεί μία από τις καλύτερες φυλές προβάτων γαλακτοπαραγωγικού τύπου με πρόωμη γενετήσια ωριμότητα και υψηλή πολυδυμία. Επιπλέον, αναφορικά με τη φυλή Lacaune, το γάλα των ζώων αυτής χρησιμοποιείται αποκλειστικά για την παρασκευή του τυριού Roquefort στη Γαλλία, ενώ τα τελευταία χρόνια έχουν εισαχθεί στη χώρα μας μεγάλοι αριθμοί ζώων της φυλής αυτής. Στις γαλακτοπαραγωγές φυλές επίσης συγκαταλέγονται και η φυλή Σαρδηνίας, η οποία μαζί με τη φυλή Awassi χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερη ανθεκτικότητα στις κλιματολογικές συνθήκες, αλλά και η φυλή Assaf.

Στον Ελλαδικό χώρο από τις πιο διαδεδομένες φυλές είναι η Καραγκούνικη που χαρακτηρίζεται από την μεγάλη ανθεκτικότητα της, η φυλή Μυτιλήνης, η Βλάχικη, η Αιγαιοπελαγίτικη, η Καρύστου, η φυλή Σερρών, Κοζάνης και Σφακίων. Επιπλέον άλλες φυλές που χαρακτηρίζονται για την πρωιμότητα, την γονιμότητα και την υψηλή γαλακτοπαραγωγική τους ικανότητα είναι οι φυλές Άρτας (Φριζάρτα) καθώς επίσης και η φυλή Χίου. Επιπλέον, κάποιες άλλες σπάνιες ελληνικές φυλές είναι η Καλαρρύτεικη, η Σκοπέλου, η φυλή Κατσικά Ιωαννίνων, η Κεφαλληνίας, η Σαρακατσάνικη, η φυλή Ανωγείων κ.α. (Σιμιτζής, 2021).

1.3 Η προβατοτροφία στον Ελλαδικό χώρο

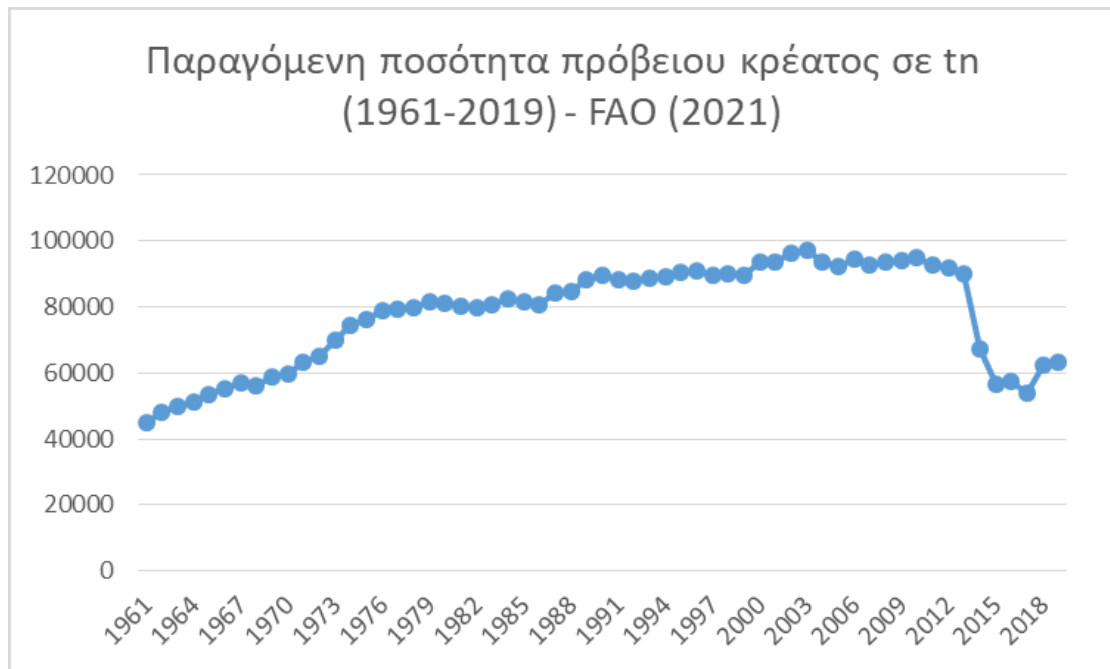
Στην Ελλάδα, τα πρόβατα που εκτρέφονται έχουν κύρια κατεύθυνση τη γαλακτοπαραγωγή και κατατάσσονται στα μακρύουρα πρόβατα ενώ με βάση το πλάτος της ουράς και την ποιότητα του μαλλιού διακρίνονται σε λεπτόουρα-παχύουρα και αναμικόμαλλα-ομοιόμαλλα, αντίστοιχα (Σιμιτζής, 2021). Επιπλέον, λόγω των ιδιαίτερων εδαφοκλιματικών και κοινωνικοοικονομικών συνθηκών της εκτρέφονται κυρίως κατά το ημιεκτατικό σύστημα ενώ μικρότερο ποσοστό εκτρέφεται κατά το εντατικό και τέλος κατά το εκτατικό σύστημα. Στον Ελλαδικό χώρο οι φυλές οι οποίες εκτρέφονται είναι κυρίως γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης με χαμηλές αποδόσεις που στο σύνολο τους όμως καλύπτουν πλήρως τις ανάγκες της χώρας σε πρόβειο γάλα και κατά 85% τις ανάγκες της σε πρόβειο κρέας. Η χώρα μας σήμερα κατέχει την πρώτη θέση στην παραγωγή πρόβειου γάλακτος με ετήσια παραγωγή 950.000 τόνους και την πέμπτη θέση στην παραγωγή πρόβειου κρέατος με παραγωγή περίπου 65.000 τόνους (FAO, 2021). Η συμμετοχή της προβατοτροφίας, που είναι ο σημαντικότερος και παράλληλα ο λιγότερο εκσυγχρονισμένος κλάδος της ελληνικής κτηνοτροφίας στη διαμόρφωση του ακαθάριστου εθνικού κτηνοτροφικού προϊόντος και στη συνολική γεωργική παραγωγή είναι σημαντική και ανέρχεται στο 36% και στο 12%, αντίστοιχα. Η ελληνική προβατοτροφία, ασκούμενη με ελάχιστες εξαιρέσεις κατά τον παραδοσιακό τρόπο, είναι κατακερματισμένη σε μικρά κυρίως ποίμνια που αντιπροσωπεύουν το 57% του συνόλου της χώρας και συγκροτείται κατά 98% από εγχώρια πρόβατα και λίγους μιγάδες (2%) με κριάρια της φυλής Φρισλανδίας και πρόσφατα της φυλής Lacaune. Η αναπαραγωγική ικανότητα των ελληνικών προβάτων αποτελεί ένα παράγοντα που επιδέχεται βελτίωση δεδομένου ότι μαζί με αυτόν θα γίνουν προσπάθειες για βελτίωση τόσο των συνθηκών εκτροφής όσο και της διαχείρισης του ποιμνίου. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι προσπάθειες αυτές θα πρέπει να είναι εναρμονισμένες με το σύστημα εκτροφής των ζώων για να είναι οικονομικά σύμφωρη η εκτροφή τους. Οι γονότυποι των εκτρεφόμενων ελληνικών προβάτων δεν είναι ιδανικοί για την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων κρέατος. Εν τούτοις, η βελτίωση των συνθηκών εκτροφής με τη χρήση, όπου είναι δυνατόν, τεχνητών λειμώνων μπορεί να επιφέρει την παραγωγή βαρύτερων σφαγίων καλής ποιότητας και ελκυστικών για το καταναλωτικό κοινό (Ζυγογιάννης, 2014).

Επιπλέον, αναφορικά με το πρόβειο γάλα (Εικόνες 1.5, 1.6 και 1.7), στις μέρες μας αρμύγονται μηχανικά 345.000 προβατίνες και η μέση γαλακτοπαραγωγή των προβάτων

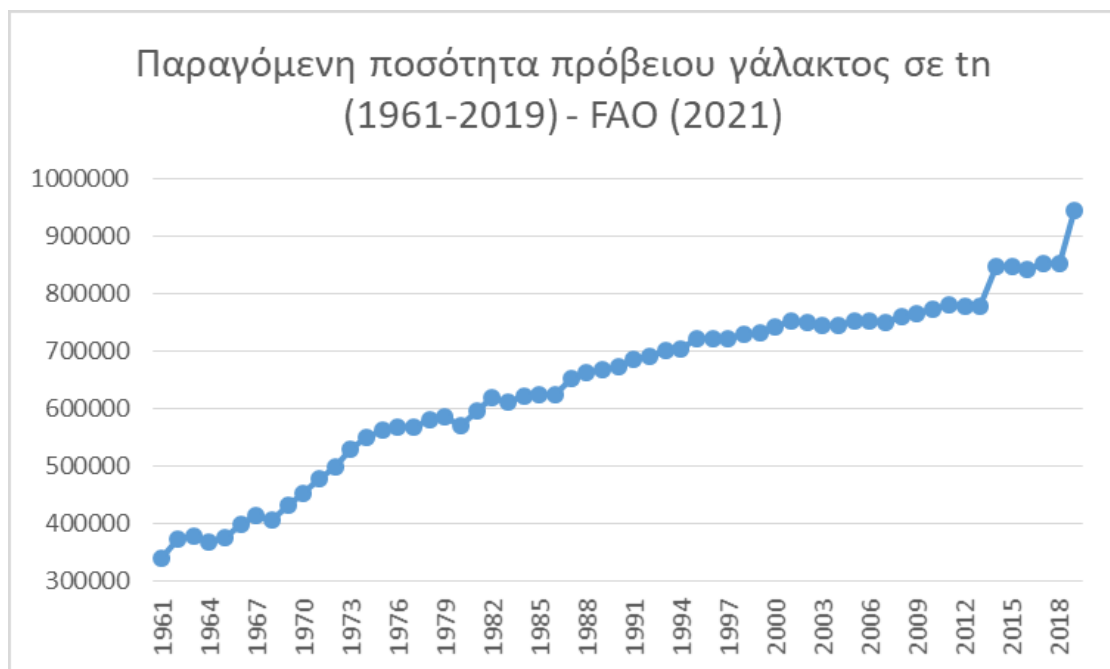
κατά αρμεχτική περίοδο είναι περίπου 220 χλγ. Η εφαρμογή αρμέγματος με μηχανή απαιτεί συγκεκριμένη διάπλαση μαστού καθώς και ομοιομορφία έκκρισης του παραγόμενου γάλακτος από τις προβατίνες του ποιμνίου, χαρακτηριστικό το οποίο διασφαλίζεται με την παρουσία ζώων σε αυτό τα οποία είναι όμοια γονοτυπικά. Επιπλέον, για να είναι σύμφωρη η επένδυση απαιτούνται ποιμνία που να αποτελούνται από περισσότερες από 250 αρμεγόμενες προβατίνες με μέση ετήσια γαλακτοπαραγωγή μεγαλύτερη από 250 χλγ γάλακτος. Είναι γεγονός ότι τα περιθώρια για βελτίωση και εκσυγχρονισμό της ελληνικής γαλακτοπαραγωγού προβατοτροφίας είναι πολλά και προκειμένου να επιτευχθεί αυτό απαιτείται ανασυγκρότηση αυτής σε όλους τους τομείς όπως τη δομή, τις συνθήκες εκτροφής, την παραγωγή, την εμπορία καθώς επίσης και την οργανωμένη ενημέρωση των προβατοτρόφων που έχουν την παράδοση με το μέρος τους (Ζυγογιάννης, 2014).



Εικόνα 1.5. Αριθμός των εκτρεφόμενων προβάτων σε Ελλάδα τα έτη 1961-2019 (FAO, 2021).



Εικόνα 1.6. Παραγόμενη ποσότητα πρόβειου κρέατος στην Ελλάδα τα έτη 1961-2019 (FAO, 2021).



Εικόνα 1.7. Παραγόμενη ποσότητα πρόβειου γάλακτος στην Ελλάδα τα έτη 1961-2019 (FAO, 2021).

1.4 Γαλακτοπαραγωγή

Τα πρόβατα στην Ελλάδα είναι κυρίως γαλακτοπαραγωγικού τύπου, αλλά τα ζώα αυτά παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία ως προς τη μορφολογία, το μέγεθος του σώματος, τη δυνατότητα αρμέγματος καθώς και την παραγωγικότητά τους, όπως επίσης και τη σύσταση του σφάγιου και το ρυθμό ανάπτυξης. Παρόλ' αυτά τα ζώα αυτά παρουσιάζουν τεράστια προσαρμοστικότητα στις δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες. Η ποσότητα του γάλακτος που παράγεται ανά ζώο και ανά έτος διαφέρει μεταξύ των φυλών παρουσιάζοντας σημαντική διακύμανση που κυμαίνεται από 90 έως 240 χλγ. Η ποσότητα του γάλακτος που παράγεται είναι στην πραγματικότητα συνάρτηση του ημερησίως παραγόμενου γάλακτος καθώς επίσης και της διάρκειας της γαλακτικής περιόδου, παράγοντες οι οποίοι εξαρτώνται και οι δύο από τη φυλή του ζώου και τη συνολική διαχείριση του ζωικού κεφαλαίου. Οι πιο παραγωγικές φυλές είναι αυτές που παρουσιάζουν και μεγαλύτερη γαλακτική περίοδο, η οποία κυμαίνεται από 200-230 ημέρες τη στιγμή που η μέση διάρκεια γαλουχίας κυμαίνεται από 160 έως 180 ημέρες (Hadjigeorgiou et al., 1998).

1.5 Αξιοποίηση του πρόβειου γάλακτος

Η αξιοποίηση του πρόβειου γάλακτος στην Ελλάδα πραγματοποιείται από μεγάλο αριθμό, μικρού μεγέθους και διάσπαρτα στο χώρο, τυροκομεία. Παρά το γεγονός ότι ο αριθμός των τυροκομείων μειώνεται υπάρχει ακόμα ένας σημαντικός αριθμός αυτών που λειτουργούν στη χώρα. Ωστόσο, οι μονάδες αυτές δεν είναι ανταγωνιστικές σε Ευρωπαϊκό επίπεδο διότι η μέση ετήσια παραγωγή ανά μονάδα είναι χαμηλή (175 τόνοι). Η διαφοροποίηση των μονάδων μεταποίησης του γάλακτος συνδέεται με τη δομή και τα συστήματα εκτροφής που επικρατούν στον κλάδο της προβατοτροφίας. Το μικρό μέγεθος των προβατοτροφικών μονάδων και η μεγάλη διασπορά τους στον Ελλαδικό χώρο, συχνά σε απομονωμένες και απομακρυσμένες περιοχές όπου βρίσκονται τα βοσκοτόπια, είναι οι λόγοι της ανάπτυξης ενός μεγάλου αριθμού τυροκομικών εγκαταστάσεων αλλά μικρής δυναμικότητας (Hadjigeorgiou et al., 1998).

1.6 Διατροφή των προβάτων

Η αύξηση της παραγωγής γάλακτος στα πρόβατα απαιτεί πιο εντατικά συστήματα εκτροφής και περισσότερα θρεπτικά συστατικά ανά ζώο απ' ό,τι είναι συνήθως απαραίτητο για τα συστήματα παραγωγής κρέατος ή μαλλιού. Κατά τη διάρκεια της γαλουχίας οι απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά είναι ιδιαίτερα υψηλές. Η ανεπαρκής σίτιση μπορεί να μειώσει τόσο το ύψος της γαλακτοπαραγωγής όσο και τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου. Η επαρκής σίτιση απαιτεί σωστή εξισορρόπηση των σιτηρεσίων, γεγονός που προϋποθέτει την εκτίμηση των απαιτήσεων σε θρεπτικά συστατικά, την εκτίμηση της ποσότητας της προσλαμβανόμενης τροφής καθώς επίσης και την εκτίμηση της θρεπτικής αξίας της τροφής.

Ο αριθμός σωματικών κυττάρων (SCC) στο γάλα επηρεάζεται από τη διατροφή, εάν συμβούν σφάλματα στη διαμόρφωση των σιτηρεσίων που μπορούν να προδιαθέτουν σε φλεγμονές του μαστικού αδένου. Η σωστή ενσωμάτωση στο σιτηρέσιο της κατάλληλης αναλογίας βιταμίνης Α, β-καροτενίου, βιταμίνης Ε και σεληνίου διαδραματίζει έναν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην ενίσχυση της ανοσολογικής απόκρισης των κυττάρων του μαστικού αδένου και συνεπώς στην παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας γάλακτος με χαμηλότερο αριθμό σωματικών κυττάρων. Μία τέτοια ενσωμάτωση είναι ιδιαίτερα σημαντική, ειδικά όταν τα πρόβατα τρέφονται κυρίως με χορτονομές (σανό ή ενσίρωση), οι οποίες εξαιτίας της παρατεταμένης αποθήκευσης μπορεί να υποστούν απώλειες σε β-καροτένιο και βιταμίνη Ε. Επιπλέον, η ξαφνική μετάβαση από ξηρά χορτονομή σε νεαρή χλωρά νομή – η οποία είναι συνήθως πλούσια σε νιτρικά – είναι επίσης συχνά υπεύθυνη για την αύξηση των σωματικών κυττάρων στο γάλα και για την καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος των προβάτων. Η περιεκτικότητα του γάλακτος σε Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα (OMX) είναι μια πολύ σημαντική παράμετρος για την εκτίμηση της ποιότητας του πρόβειου γάλακτος αλλά η διατροφή έχει μικρή επίδραση σε αυτό. Τα βακτήρια και άλλοι μικροοργανισμοί στο γάλα προέρχονται κυρίως από το περιβάλλον και ο έλεγχός τους εξαρτάται από την αποτελεσματικότητα των αρμεκτικών πρακτικών στη διατήρηση ενός καθαρού μαστού. Μη ορθολογική διατροφή π.χ. περίσσεια αζώτου με ανεπαρκείς φυτικές ίνες μπορεί να δημιουργήσει μη φυσιολογικές ζυμώσεις στη μεγάλη κοιλία και στο έντερο με αποτέλεσμα την παραγωγή μολυσματικών κοπράνων εξαιτίας του υψηλού μικροβιακού τους φορτίου και του μεγάλου όγκου τους. Η χρήση κακώς διατηρημένων ενσιρωμάτων π.χ. ενσιρώματος που έχει υποστεί ανώμαλες

ζυμώσεις ή ενσιρώματος που περιέχει μολυσματικά συστατικά μπορεί να αυξήσει τους αριθμούς των βακτηρίων στο γάλα ιδιαίτερα του *Clostridium* spp. Οι μικροοργανισμοί αυτοί με τη σειρά τους μπορούν να αποβούν επιζήμιοι κατά την τυροκόμηση προκαλώντας τη λεγόμενη «όψιμη διόγκωση» σε τυριά που ωριμάζουν για μεγάλα χρονικά διαστήματα όπως το Pecorino κλπ. η οποία οφείλεται στις τεράστιες ποσότητες αερίου που παράγονται από τα *Clostridia* (Nudda et al., 2004).

2. Παθήσεις του μαστού

Οι λοιμώξεις του μαστού μπορεί να οδηγήσουν σε διάφορες κλινικές ή υποκλινικές ασθένειες στα πρόβατα. Αυτές περιλαμβάνουν τη βακτηριακή μαστίτιδα (μαστίτιδα), τη μαστίτιδα από μυκόπλασμα (μεταδοτική αγαλαξία) και τη φακοική λοίμωξη του μαστού (Gelasakis et al., 2015). Η μαστίτιδα (Mastitis, Bluebag, Garget), δηλαδή η φλεγμονή του μαστού ή του μαστικού αδένου, είναι πάθηση με σοβαρές οικονομικές επιπτώσεις στην προβατοτροφία ανεξάρτητα από το εφαρμοζόμενο σύστημα εκτροφής των ζώων. Οι επιπτώσεις αυτές, προέρχονται από τους θανάτους των ζώων (προβατίνων και των γαλουχούμενων λόγω αστίας αρνιών τους) ή σε περίπτωση επιβίωσής τους, από τη μειωμένη γαλακτοπαραγωγή και τον μη φυσιολογικό πρόιμο τερματισμό της γαλακτικής περιόδου, που συνεπάγεται μειωμένο αυξητικό ρυθμό των γαλουχούμενων αρνιών και εμπορεύσιμο γάλα, αν οι προβατίνες αρμέγονται. Επιπρόσθετα, στις οικονομικές επιπτώσεις περιλαμβάνονται και οι δαπάνες τόσο σε χρήματα όσο και σε εργατικά χέρια για την εφαρμογή της κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής, η οποία δεν είναι πάντοτε αποτελεσματική (Ζυγογιάννης, 2014). Η σωστή διαχείριση του ποιμνίου αποτελεί μία από τις σημαντικότερες μεθόδους για τον έλεγχο της μαστίτιδας. Πιο συγκεκριμένα, δεδομένης της πολυπαραγοντικής φύσης της μαστίτιδας η σωστή διαχείριση περιλαμβάνει ένα ευρύ φάσμα δραστηριοτήτων μεταξύ των οποίων είναι η θεραπεία της νόσου (είτε της κλινικής, είτε της υποκλινικής μορφής της), η επιβολή της ξηράς περιόδου στα ζώα, προκειμένου να αποφευχθεί η μετάδοση της νόσου από ζώο σε ζώο είτε από το περιβάλλον εκτροφής και η ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος του ζώου (Halasa et al., 2007). Για τις περισσότερες μονάδες η υποκλινική μαστίτιδα είναι η πιο σημαντική μορφή μαστίτιδας από οικονομική άποψη, λόγω της μακροχρόνιας μείωσης των παραγόμενων ποσοτήτων γάλακτος. Υπολογίζεται ότι οι απώλειες στην παραγωγή, που οφείλονται στην υποκλινική μαστίτιδα κοστίζουν 1 δις ετησίως στις γαλακτοβιομηχανίες (Ruegg et al., 2003). Οι οικονομικές συνέπειες της μαστίτιδας (κλινικής και υποκλινικής) οφείλονται στο κόστος για τη θεραπεία αυτής, στη μείωση της παραγωγής, στη θανάτωση ζώων όταν αυτό είναι απαραίτητο, στις αλλαγές στην ποιότητα των παραγόμενων προϊόντων καθώς και τον κίνδυνο εμφάνισης άλλων ασθενειών. Το σχετικό κόστος μπορεί να διαιρεθεί στους ακόλουθους παράγοντες: απώλειες παραγωγής γάλακτος, φάρμακα για περίθαλψη, γάλα το οποίο απορρίπτεται, κτηνιατρικές υπηρεσίες, εργασία, υποβαθμισμένη ποιότητα προϊόντων, διαγνωστικά, άλλες ασθένειες και τη σφαγή (Halasa et al., 2007).

2.1 Η μαστίτιδα

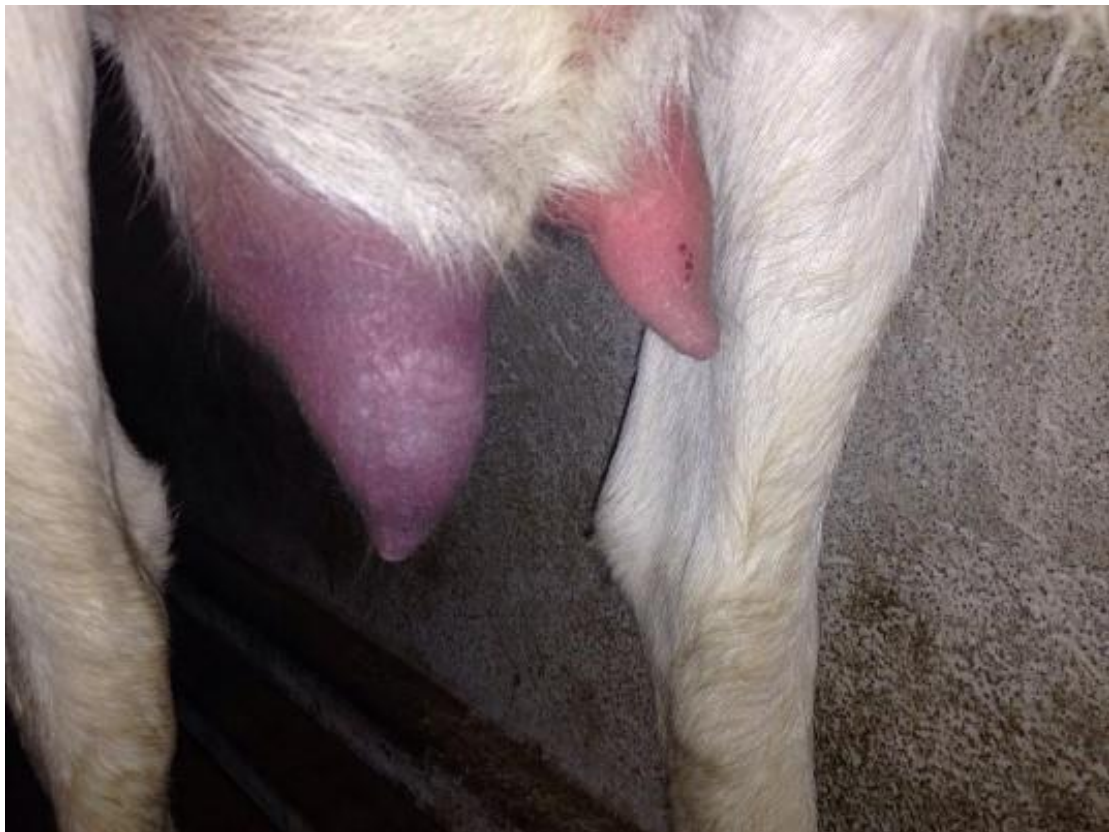
Αναφορικά, η μαστίτιδα αποτελεί φλεγμονή του μαστικού αδένου που μπορεί να προκληθεί είτε από κάποια μόλυνση από παθογόνο (ενδομαστική λοίμωξη) είτε από κάποιο τραυματισμό και σπανιότερα από αλλεργία και νεόπλασμα. Εάν η φλεγμονή είναι παρούσα αλλά δεν έχει ανιχνευτεί κάποιο παθογόνο, τότε ο μαστός, ίσως, έχει τραυματιστεί, είτε βρίσκεται σε φάση ανάρρωσης από κάποια μόλυνση από την οποία έχει αυτοθεραπευθεί, είτε ότι η μόλυνση δεν οφείλεται μόνο σε ένα βακτήριο είτε ότι η τεχνική δειγματοληψίας και καλλιέργειας ήταν ελαττωματική. Η βιβλιογραφία ποικίλλει σημαντικά αναφορικά με το επίπεδο πάνω από το οποίο η παρουσία ενός παθογόνου θεωρείται ότι προκαλεί σημαντική μόλυνση. Ωστόσο, εάν το παθογόνο ή η παρουσία φλεγμονής επηρεάζει αρνητικά το επίπεδο παραγωγής ή την ποιότητα των γαλακτοκομικών προϊόντων τότε αποκτά ιδιαίτερη σημασία για τον παραγωγό (Menzies & Ramanoon, 2001).

2.2 Διάκριση των τύπων μαστίτιδας

Οξεία ή κλινική μαστίτιδα

Οι μαστίτιδες διακρίνονται σε οξείες, οι οποίες χαρακτηρίζονται από ξαφνικά, έντονα και με πολύ γρήγορη εξέλιξη (1-2 ημέρες) κλινικά συμπτώματα και στις χρόνιες ή υποκλινικές, οι οποίες χαρακτηρίζονται από απουσία σαφών κλινικών συμπτωμάτων, είναι βραδείας εξέλιξης και δεν απειλούν τη ζωή του ζώου. Βάσει του αιτιολογικού παράγοντα και των κλινικών συμπτωμάτων οι οξείες μαστίτιδες κατατάσσονται σε γαγγραινώδεις (Εικόνα 2.1) και σε σκληρωτικές. Κύριο παθογόνο αίτιο της γαγγραινώδους μαστίτιδας είναι ο *Staphylococcus aureus* και σπανιότερα το *Clostridium perfringens* και της σκληρωτικής η *Pasterella haemolytica*. Η κλινική μαστίτιδα μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε στιγμή της γαλουχίας ή της ξηράς περιόδου ενώ η υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης κλινικής μαστίτιδας φαίνεται να είναι τις πρώτες μέρες μετά τον τοκετό και έχουν γρήγορη εξέλιξη. Εκδηλώνονται ξαφνικά με έντονο και επώδυνο οίδημα και φλεγμονή του ενός ημιμορίου ή και ολόκληρου του μαστού, χωλότητα μέχρι προσωρινής αγκύλωσης των οπίσθιων άκρων, πλήρη ανορεξία και αύξηση της θερμοκρασίας του σώματος, καθώς και άρνηση θηλασμού των αρνιών τα οποία καταλήγουν να πεθαίνουν από ασιτία. Στη συνέχεια ο μαστός μελανιάζει (γάγγραινα)

λόγω των πολλαπλών θρομβώσεων των αιμοφόρων αγγείων που προκαλεί ο υπεύθυνος αιτιολογικός παράγοντας και η έξοδος μετά από πίεση της θηλής, αιματηρού υγρού με πήγματα αίματος. Η νόσος τελικά, εξελίσσεται σε γάγγραινα του μαστού (μερική ή ολική) με όλα τα χαρακτηριστικά της συμπτώματα (κρύος και σχετικά ανώδυνος ζυμώδης μελανός μαστός), που οδηγεί το ζώο στο θάνατο ή στην αποξήρανση και απόπτωση, μερική ή ολική, του μαστού μετά από 1-2 μήνες. Στην περίπτωση της σκληρωτικής μαστίτιδας, δεν εγκαθίσταται γάγγραινα, ο μαστός είναι σκληρός, ερυθρομελανός και επώδυνος με οροαιματηρό και με πήγματα αίματος έκκριμα (Ζυγογιάννης, 2014).



Εικόνα 2.1. Εικόνα μαστού αίγας με γαγγραινώδη μαστίτιδα (Nishimura et al., 2011).

Χρόνια ή υποκλινική μαστίτιδα

Οι χρόνιες ή υποκλινικές μαστίτιδες αποτελούν μία από τις σπουδαιότερες αιτίες που καθιστούν οικονομικά ασύμφορη την περαιτέρω διατήρηση των προβατίνων στο ποίμνιο επιβάλλοντας την αξιοποίηση του σφαγίου τους στον καταλληλότερο για το σκοπό αυτό χρόνο. Η υποκλινική μαστίτιδα μειώνει τη γαλακτοπαραγωγή με τρόπο που δεν γίνεται εύκολα αντιληπτός, καθώς επίσης και την γαλακτική περίοδο των ζώων με την πρόωρη

στείρευση που προκαλεί. Για τη μαστίτιδα αυτής της μορφής ευθύνονται διάφοροι παθογόνοι μικροοργανισμοί όπως οι *Bacillus sp.*, *Staphylococcus epidermitis*, *E. coli*, κλπ καθώς επίσης και περιβαλλοντικοί παράγοντες οι οποίοι ασκούν τη δυσμενή τους δράση στο μαστό άμεσα ή έμμεσα. Στα κρεοπαραγωγά ή εριοπαραγωγά εκτρεφόμενα πρόβατα η χρόνια ή υποκλινική μαστίτιδα γίνεται αντιληπτή έμμεσα από τον μειωμένο αυξητικό ρυθμό των αρνιών που ανάλογα με την ένταση της ασθένειας μπορεί να επιφέρει και τον θάνατο τους από αστία. Στα γαλακτοπαραγωγά εκτρεφόμενα ζώα, η χρόνια ή υποκλινική μαστίτιδα γίνεται πιο εύκολα αντιληπτή καθώς η γαλακτοπαραγωγή μειώνεται χωρίς εμφανείς αλλοιώσεις του μαστού και του παραγόμενου γάλακτος. Ωστόσο, υπάρχει το ενδεχόμενο στο γάλα να εμφανιστούν ψήγματα, αλλαγές στο pH, αλλαγές στη χημική του σύσταση καθώς επίσης και αυξημένος αριθμός σωματικών κυττάρων (Ζυγογιάννης, 2014).

2.3 Πιθανοί παράγοντες που μπορεί να οδηγήσουν στην εμφάνιση μαστίτιδας

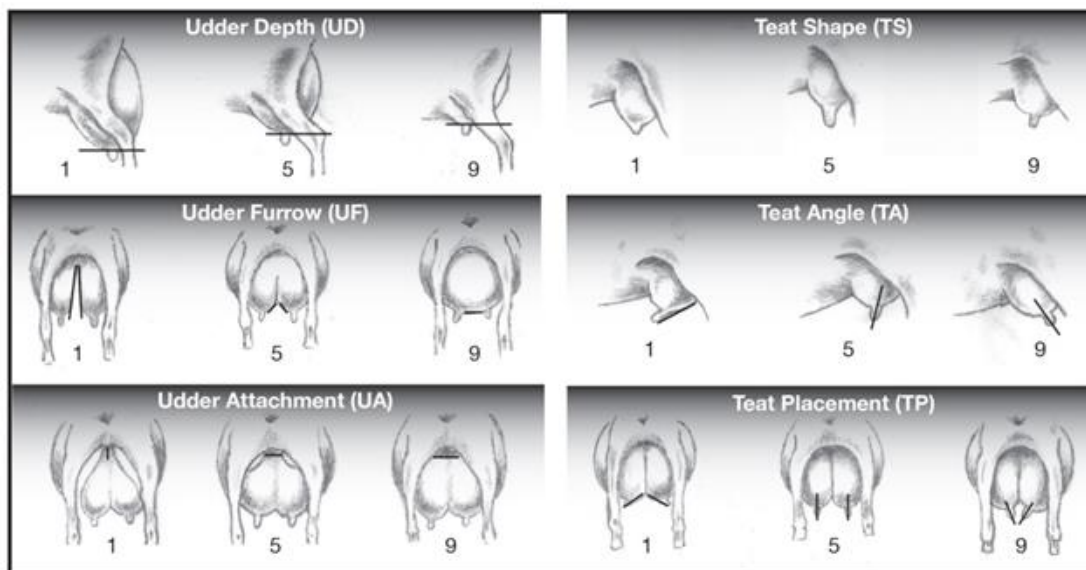
Τραυματισμός της θηλής ή του μαστού

Η πιθανότητα εμφάνισης μαστίτιδας σε προβατίνες μη γαλακτοπαραγωγικού τύπου συνδέεται με το μέγεθος των αρνιών που θηλάζουν την προβατίνα. Πιο συγκεκριμένα, έχει διατυπωθεί στο παρελθόν ότι το μέγεθος των αρνιών μπορεί να επηρεάσει την κατάσταση της υγείας των θηλών ή των μαστών. Βάσει αυτής της θεωρίας, τα μεγαλύτερα σε μέγεθος αρνιά είναι πιθανό κατά τον θηλασμό να τραυματίσουν τις θηλές ή τον μαστό της μητέρας τους με αποτέλεσμα την είσοδο του μικροοργανισμού *Pasteurella*. Εντούτοις, η θεωρία αυτή δεν έχει αποδειχτεί και βρίσκεται ακόμη υπό διερεύνηση (Menzies & Ramanoon, 2001).

Η διαμόρφωση του μαστού

Μια κακή διαμόρφωση του μαστού (π.χ. υπεράριθμες θηλές ή υπερμεγέθεις θηλές, κακοσχηματισμένοι μαστοί) μπορεί να συμβάλλει στην εμφάνιση της μαστίτιδας. Η μη σωστή διαμόρφωση του μαστού και των θηλών μπορεί να δημιουργήσει δυσκολίες κατά τον θηλασμό των αρνιών με αποτέλεσμα την μη ολοκληρωτική άμελξη του μαστού (άδειασμα) με αποτέλεσμα ακόμη και την εμφάνιση μαστίτιδας (Menzies and Ramanoon,

2001). Η μορφολογία του μαστού έχει ερευνηθεί καλά για τα γαλακτοπαραγωγά ζώα και τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί το ενδιαφέρον και για τα ζώα που εκτρέφονται για την παραγωγή κρέατος. Ανάλογα τον τύπο του συστήματος (γαλακτοπαραγωγικού ή κρεοπαραγωγικού) μπορεί να υπάρχουν διαφορές στις προτιμήσεις συγκεκριμένων χαρακτηριστικών. Οι γεμάτοι, σφαιρικοί και βαθιοί μαστοί προτιμώνται συχνά ως ένδειξη καλής γαλακτοπαραγωγής. Παρόλα αυτά οι πολύ κρεμάμενοι μαστοί δεν προτιμώνται, καθώς είναι πιο δύσκολο να αρμέγονται, πιο δύσκολο για τα αρνιά να έχουν πρόσβαση σε αυτούς και συχνά είναι πιο επιρρεπείς σε τραυματισμούς. Ιδιαίτερης σημασίας είναι επίσης η τοποθέτηση και το μέγεθος των θηλών. Η σωστή θέση και το σωστό μέγεθος των θηλών, στα γαλακτοκοπαραγωγικά συστήματα, διευκολύνει την εισαγωγή του κυπέλου κατά τη μηχανική άμελξη, καθώς επίσης και τον εύκολο θηλασμό από τα αρνιά κατά τη φυσική γαλουχία. Επιπλέον, το μέγεθος της θηλής αποτελεί ένα εξίσου σημαντικό χαρακτηριστικό καθώς οι πολύ μεγάλες θηλές δυσκολεύουν την άμελξη από τα αρνιά, ενώ οι πολύ μεγάλες ή πολύ μικρές θηλές μπορεί να μην ταιριάζουν στο μηχανικό κύπελο αρμέγματος. Η αξιολόγηση της μορφολογίας του μαστού μπορεί να πραγματοποιηθεί τόσο με άμεσες μετρήσεις όπως και με υποκειμενική αξιολόγηση διάφορων χαρακτηριστικών που σχετίζονται με τη μορφολογία χρησιμοποιώντας γραμμικά συστήματα βαθμολόγησης. Τα χαρακτηριστικά αυτά τα οποία θεωρούνται τα πιο σημαντικά στα προγράμματα εκτροφής προβάτων γαλακτοπαραγωγής είναι το βάθος ή ύψος του μαστού, η εισαγωγή του μαστού δηλαδή η περίμετρος αυτού στο σημείο που προσαρτάται στο κοιλιακό τοίχωμα, η γωνία της θηλής και το μήκος της θηλής. Η κύρια ασθένεια που σχετίζεται με τον μαστό του προβάτου είναι η μαστίτιδα και εκτός από την ύπαρξη της κλινικής μορφής αυτής και ο αριθμός των σωματικών κυττάρων στο γάλα αποτελεί, επίσης, ένδειξη για την κατάσταση της υγείας τους μαστού και της ποιότητας του γάλακτος. Έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί έχουν δείξει ότι οι μαστοί με καλύτερο σχήμα είναι λιγότερο επιρρεπείς στην μαστίτιδα. Αν και υπάρχουν διαφορές μεταξύ των διάφορων φυλών, το μέγεθος και η τοποθέτηση των θηλών αλλά και το βάθος των μαστών μπορεί να προδιαθέσουν επίσης το ζώο στην εμφάνιση μαστίτιδας (Εικόνα 2.2, Eurosheep network, 2018).



Scoring Trait	1 p	5 p	9 p
Udder Depth			
Udder Attachment			
Teat placement			
Teat size			

Εικόνα 2.2. Μερικά παραδείγματα γραμμικών βαθμολογιών μορφολογίας μαστού και θηλής (Eurosheep network, 2018).

Ο αριθμός των θηλαζόντων αρνιών

Ο αριθμός των θηλαζόντων αρνιών, έχει βρεθεί, ότι μπορεί να έχει θετική συσχέτιση με την πιθανότητα εμφάνισης της μαστίτιδας στις προβατίνες. Αυτό υποδηλώνει ότι ο έντονος θηλασμός από περισσότερα από ένα αρνιά μπορεί να εντείνει την πιθανότητα εμφάνισης μαστίτιδας. Παρόλα αυτά ο παράγοντας αυτός είναι μικρότερης βαρύτητας σε

σχέση με άλλους αναφορικά με την επίδραση του στην εμφάνιση της μαστίτιδας στα πρόβατα (Menzies & Ramanoon, 2001).

Η ηλικία της προβατίνας

Σε γενικές γραμμές υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ του ενδεχομένου εμφάνισης μαστίτιδας και της ηλικίας της προβατίνας. Πιο συγκεκριμένα όσο μεγαλύτερη σε ηλικία είναι η προβατίνα τόσο περισσότερες και οι πιθανότητες εμφάνισης της μαστίτιδας (Menzies and Ramanoon, 2001).

Διάρκεια της ξηράς περιόδου

Η διάρκεια της ξηράς περιόδου διαδραματίζει ένα σημαντικό παράγοντα ο οποίος επηρεάζει την πιθανότητα εμφάνισης της μαστίτιδας. Πιο συγκεκριμένα, εάν η ξηρά περίοδος διαρκεί περισσότερο από 60 ημέρες τόσο περισσότερες είναι και οι πιθανότητες εμφάνισης της μαστίτιδας (Menzies & Ramanoon, 2001).

Στάδιο της γαλουχίας

Βάσει ερευνών έχει αποδειχθεί ότι ο επιπολασμός της υποκλινικής μαστίτιδας αυξάνεται στο τρίτο στάδιο της γαλουχίας (Menzies & Ramanoon, 2001).

Σύστημα άμελξης και διαχείριση

Τα πρόβατα, τα οποία αρμέγονται με το χέρι, έχουν περισσότερες πιθανότητες να εμφανίσουν υποκλινική μαστίτιδα, η οποία μπορεί να οφείλεται κυρίως στον μικροοργανισμό *S. Epidermidis*. Επιπλέον, η υψηλή πυκνότητα στέγασης έχει δυσμενή επίδραση τόσο στην ποσότητα του παραγόμενου γάλακτος όσο και στην υγεία του μαστού του ζώου. Αναφορικά, ζώα που στεγάζονται σε πυκνότητα 2 τ.μ./ ζώο φαίνεται να είναι περισσότερο υγιή από ζώα τα οποία στεγάζονται σε μεγαλύτερες πυκνότητες (Menzies & Ramanoon, 2001).

Το ύψος της γαλακτοπαραγωγής

Σύμφωνα με μελέτη η οποία πραγματοποιήθηκε σε πρόβατα γαλακτοπαραγωγής, η πιθανότητα εμφάνισης υποκλινικής μαστίτιδας αυξανόταν όταν τα ζώα ήταν περισσότερο παραγωγικά σε σχέση με τα ζώα που παρήγαγαν μικρότερες ποσότητες γάλακτος (Menzies & Ramanoon, 2001).

Ο γονότυπος των ζώων

Είναι δυνατόν βάσει γονοτύπου κάποιες φυλές προβάτων να είναι περισσότερο επιρρεπείς στην εκδήλωση μαστίτιδας σε κάποια φάση της ζωής τους. Παρόλα αυτό μέσω της επιλογής των κατάλληλων ζώων, σε κάποια προγράμματα αναπαραγωγής, μπορούν να προκύψουν περισσότεροι απόγονοι, οι οποίοι θα είναι λιγότερο επιρρεπείς στο ενδεχόμενο εμφάνισης μαστίτιδας (Menzies & Ramanoon, 2001).

2.4 Παθολογικοί παράγοντες που μπορεί να οδηγήσουν στην εμφάνιση μαστίτιδας

Staphylococcus aureus

Ο *Staphylococcus aureus* είναι το πιο κοινό παθογόνο το οποίο σχετίζεται με την μαστίτιδα στα πρόβατα. Το βακτήριο αυτό έχει αποδειχτεί ότι οφείλεται για το 40% των κρουσμάτων μαστίτιδας σε προβατίνες που θηλάζουν και για το 80 % των κρουσμάτων μαστίτιδας σε προβατίνες που αρμέγονται. Τα τελευταία χρόνια στελέχη του *S. aureus* τα οποία παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά θεωρούνται σαν απειλή για τη δημόσια υγεία. Αντικείμενο πολλών μελετών ερευνών που έχουν πραγματοποιηθεί ήταν η εκτίμηση αυτών των προτύπων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά των διάφορων στελεχών του *S. aureus* μέσω της απομόνωσης αυτών από διάφορες περιπτώσεις μαστίτιδας στα πρόβατα. Επιπλέον, έχει μελετηθεί η δυναμικότητα αυτών των ανθεκτικών στελεχών όσον αφορά στην επιβίωσή τους στα γαλακτοκομικά προϊόντα καθώς και τις συνέπειες αυτών στη δημόσια υγεία. Σύμφωνα με έρευνα που πραγματοποιήθηκε κατά την οποία μελετήθηκε η ευαισθησία στα αντιβιοτικά 1284 στελεχών του *S. aureus* από περιπτώσεις μαστίτιδας προβάτων και αποδείχτηκε ότι διέθεταν αυξημένο ποσοστό αντίστασης στη στρεπτομυκίνη (48%-87%) με μικρότερα ποσοστά αντίστασης να διαθέτουν στην πενικιλίνη ή την αμπικιλίνη (2- 12% ή 0- 12% αντίστοιχα).

Mannheimia spp

Ένα ακόμη παθογόνο υπεύθυνο για την πρόκληση μαστίτιδας αποτελεί το είδος *Mannheimia* και πιο συγκεκριμένα τα στελέχη *M. haemolytica*, *M. glucosida*, *M. Ruminalis*, τα οποία έχουν απομονωθεί από περιπτώσεις οξείας μαστίτιδας σε πρόβατα. Μάλιστα, το *M. haemolytica* επιβεβαιώνεται ως ο συχνότερος παράγοντας πρόκλησης μαστίτιδας σε κοπάδια προβάτων κρεοπαραγωγικού τύπου. Αντιθέτως, στα πρόβατα

γαλακτοπαραγωγικού τύπου οι περιπτώσεις ενδομαστικών λοιμώξεων που βρέθηκαν να οφείλονται στο συγκεκριμένο στέλεχος αποτελούσαν μόνο το 11% του συνόλου των περιπτώσεων.

Streptococcus spp.

Τα στελέχη της οικογένειας *Streptococcus* αποτελούν σποραδικά παθογόνα της μαστίτιδας των προβάτων (Contreras and Rodríguez, 2011). Αυξημένα ποσοστά μαστίτιδας που οφείλονται στα συγκεκριμένα παθογόνα σχετίζονται με ακατάλληλες συνθήκες στέγασης ή πρακτικές άμελξης όπως αποδείχτηκε από μελέτες της νόσου, που πραγματοποιήθηκαν σε κοπάδια στην Ιταλία και την Γερμανία όπου η πιθανότητα εμφάνισης των παθογόνων ως αιτία των περιστατικών μαστίτιδας κυμαίνονταν σε ποσοστό 23-31% (Gelasakis, et al., 2015).

Άλλα βακτήρια

Άλλα βακτήρια τα οποία είναι υπεύθυνα για την πρόκληση μαστίτιδας αποτελούν ορισμένα Gram – θετικά βακτήρια όπως το *Bacillus cereus*, το *Clostridium spp.* (, το *Corynebacterium spp.*, το *Enterococcus spp.*, το *Listeria monocytogenes*, το *Micrococcus spp.*, το *Mycobacterium spp.* και το *Trueperella pyogenes*. Επιπλέον και κάποια Gram αρνητικά βακτήρια μετά από απομόνωσή τους έχει αποδειχτεί ότι μπορεί να οφείλονται για ορισμένα περιστατικά μαστίτιδας με τα πιο σημαντικά από αυτά να αποτελούν το *Citrobacter spp.*, το *Escherichia coli*, το *Enterobacter spp.*, το *Klebsiella spp.*, το *Pasteurella multocida*, το *Proteus spp.*, το *Pseudomonas aeruginosa*, το *Salmonella spp.*, το *Serratia spp.*, και το *Yersinia pseudotuberculosis*, που αντιπροσωπεύουν περίπου το 3% όλων των οργανισμών που απομονώθηκαν από το πρόβειο γάλα (Bergonier et al., 2003). Οι μικροοργανισμοί αυτοί θεωρούνται περιβαλλοντικοί και είναι ικανοί να προκαλέσουν κλινική μαστίτιδα ανάλογα με την ανοσολογική κατάσταση των ζώων που εκτίθενται σε αυτά (Contreras & Rodríguez, 2011). Ανησυχίες έχουν προκύψει από την μόλυνση του γάλακτος με τους παραπάνω μικροοργανισμούς σχετικά με τη δημόσια υγεία ειδικά όταν παράγεται πρόβειο γάλα προς κατανάλωση από τον άνθρωπο. Τέλος, κατά καιρούς έχουν παρατηρηθεί περιστατικά μαστίτιδας που οφείλονται σε μύκητες, με μικρότερη όμως συχνότητα σε σχέση με τους ανωτέρω μικροοργανισμούς (Gelasakis, et al., 2015).

3. Αριθμός σωματικών κυττάρων

Ο αριθμός των σωματικών κυττάρων στα μηρυκαστικά αντιπροσωπεύει τους διαφορετικούς τύπους κυττάρων που υπάρχουν στο γάλα, συμπεριλαμβανομένων των λευκοκυττάρων και των επιθηλιακών κυττάρων. Τα κυτταροπλασματικά σωματίδια που περιέχονται στο γάλα των προβατίνων είναι παρόμοια σε μέγεθος με τα σωματικά κύτταρα του γάλακτος, τα οποία αποτελούν φυσιολογικά συστατικά του γάλακτός τους. Τα σωματίδια αυτά δεν ταξινομούνται ως κύτταρα καθώς δεν διαθέτουν πυρήνες αλλά ούτε και δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA), αν και περιέχουν μεγάλες ποσότητες ριβονουκλεϊκού οξέος (RNA) και πρωτεϊνών. Είναι γεγονός, πως υπάρχουν πολλές διαφορές στο γάλα των διάφορων μηρυκαστικών ζώων σε σχέση με τα σωματικά κύτταρα (Souza et al., 2012). Συγκεκριμένα, στο αγελαδινό γάλα, κυριαρχούν τα μακροφάγα κύτταρα, ενώ αντίθετα στο κατσικίσιο γάλα τα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα είναι αυτά που επικρατούν είτε στην περίπτωση μολυσμένου είτε στην περίπτωση μη μολυσμένου γάλακτος. Εντούτοις, τα στοιχεία που αφορούν τις μεταβολές των σωματικών κυττάρων στις προβατίνες κατά τη διάρκεια της γαλουχίας είναι περιορισμένα. Όπως και στις αγελάδες ο κυρίαρχος τύπος κυττάρων στα πρόβατα είναι τα μακροφάγα και το ποσοστό αυτών κυμαίνεται από 46-84% στο γάλα που προέρχεται από μη μολυσμένους αδένες ζώων. Από την άλλη τα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα αποτελούν το 2-28% του συνόλου των σωματικών κυττάρων ενώ τα λεμφοκύτταρα κυμαίνονται από 11-20%. Τα πλασμοκύτταρα βρίσκονται σε μικρούς πληθυσμούς στο πρωτόγαλα (0-20%), όπως επίσης και τα επιθηλιακά κύτταρα (1-2%). Όταν υπάρχει μόλυνση στους μαστικούς αδένες το ποσοστό των πολυμορφοπύρρηνων ουδετερόφιλων αυξάνεται κατά 50%, ποσοστό το οποίο μπορεί να φτάσει και το 90%. Τα κυτταροπλασματικά σωματίδια είναι φυσιολογικά συστατικά τόσο του πρόβειου γάλακτος όσο και του πρόβειου πρωτογάλακτος. Παρόλα αυτά οι συγκεντρώσεις αυτών είναι 10 φορές μικρότερες από αυτές στο κατσικίσιο γάλα. (Paape et al., 2007)

3.1 Μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την αύξηση του αριθμού των σωματικών κυττάρων κατά τη μόλυνση του μαστού

Η αύξηση του αριθμού των σωματικών κυττάρων κατά τη διάρκεια μιας ενδομαστικής λοίμωξης αποτελούν ουσιαστικό μέρος της άμυνας του μαστικού αδένα ενάντια στην

εισβολή του παθογόνου. Η αρχική αύξηση του αριθμού των σωματικών κυττάρων στο γάλα οφείλεται κυρίως στην στρατολόγηση των πολυμορφοπύρηνων μακροφάγων από την κυκλοφορία του αίματος στον φλεγμονώδη ιστό. Μόλις τα πολυμορφοπύρηννα ουδετερόφιλα μεταναστεύσουν στον αδένα και ενεργοποιηθούν απελευθερώνουν μια σειρά από αντιβακτηριδιακά συστατικά τα οποία είναι απαραίτητα για την εκκαθάριση του μολυσματικού παθογόνου από τον ξενιστή. Μέσα στην τελευταία δεκαετία οι μηχανισμοί στρατολόγησης των πολυμορφοπύρηνων ουδετερόφιλων έχουν μελετηθεί εκτενώς στα μικρά μηρυκαστικά και κυρίως τα πρόβατα. Σημαντικό ρόλο στην στρατολόγηση αυτών με στόχο τους φλεγμονώδεις ιστούς διαδραματίζουν οι κυτοκίνες (Paape et al., 2007). Εξίσου σημαντικός είναι και ο ρόλος των μακροφάγων στο να επιτηρούν τους μη μολυσμένους αδένες. Όταν τα βακτήρια εισβάλλουν και αποικίζουν τον μαστικό αδένα τα μακροφάγα ανταποκρίνονται με την έναρξη της φλεγμονώδους απόκρισης που προσελκύει τα πολυμορφοπύρηννα στο γάλα προκειμένου να καταστρέψουν τα βακτήρια. Επιπλέον, με την εμφάνιση της μόλυνσης ο ζωικός οργανισμός μέσω της ενεργοποίησης των μακροφάγων αποσκοπεί επίσης στην εξουδετέρωση των βακτηρίων. Ενώ, όσον αφορά στα ουδετερόφιλα, όταν αυτά αποτελούν μεγαλύτερο ποσοστό του 90% στους ιστούς και ο αριθμός των σωματικών κυττάρων είναι μεγαλύτερος του 1.500.000 (για τα αιγοπρόβατα) τότε το πιο πιθανό ενδεχόμενο είναι το ζώο να πάσχει από μαστίτιδα (Ruegg, 2003).

3.2 Ο ρόλος των κυρίαρχων τύπων κυττάρων στο γάλα των μηρυκαστικών κατά την εμφάνιση της φλεγμονής

Τα σωματικά κύτταρα

Ο μαστός ή μαστικός αδένας σε όλα τα είδη των θηλαστικών ζώων έχει εξελιχθεί προκειμένου αυτά να θρέψουν τα μικρά τους. Ωστόσο, μέσω της γενετικής επιλογής και της προόδου στην τεχνολογία του αρμέγματος, ο μαστικός αδένας παράγει πλέον περισσότερο γάλα από αυτό που μπορεί να καταναλώσει το νεογνό και πολύ μεγαλύτερες ποσότητες από αυτές που ήταν αρχικά σχεδιασμένο το όργανο να φιλοξενεί. Η επιλογή των γαλακτοπαραγωγών ζώων για μεγαλύτερη παραγωγή γάλακτος και η απομάκρυνση του γάλακτος μέσω αμελκτικής μηχανής μπορεί να προκαλέσει καταπόνηση στο μαστό των γαλακτοπαραγωγών ζώων και κατά συνέπεια να αυξήσει τις πιθανότητες εμφάνισης λοιμώξεων των μαστών στα ζώα αυτά. Προκειμένου ο μαστός να αμυνθεί έναντι αυτών

των λοιμώξεων, τα σωματικά κύτταρα απελευθερώνονται στο γάλα, τα οποία όχι μόνο μάχονται ενάντια στη λοίμωξη αλλά συμβάλλουν και στην αποκατάσταση της βλάβης των ιστών. Σε όλες τις ανεπτυγμένες χώρες ο αριθμός των σωματικών κυττάρων (SCC) αποτελεί δείκτη για την παρακολούθηση του επιπολασμού της μαστίτιδας, δείκτη της ποιότητας του νοπού γάλακτος και δείκτη των συνθηκών υγιεινής των μονάδων παραγωγής γάλακτος. Από όλους τους ελέγχους που πραγματοποιούνται για τον έλεγχο της ποιότητας του γάλακτος η εκτίμηση των σωματικών κυττάρων του γάλακτος αποτελεί την πιο αποτελεσματική μέθοδο για την εκτίμηση της υποκλινικής μορφής της μαστίτιδας (Alhussien & Dang, 2018).

Προέλευση των σωματικών κυττάρων και τα είδη που τα αποτελούν

Τα σωματικά κύτταρα στο γάλα είναι δύο ειδών: τα επιθηλιακά κύτταρα από το μαστό και τα λευκοκύτταρα από το αίμα. Τα επιθηλιακά κύτταρα υπάρχουν στο φυσιολογικό γάλα και αυξάνονται στα όψιμα στάδια της γαλουχίας καθώς ο αδένας προετοιμάζεται να είναι μη λειτουργικός ή ως συνέπεια τραυματισμού. Η αύξηση των κυττάρων αυτών κατά την πρώτη γαλουχία είναι ελάχιστη αλλά είναι περισσότερο έντονη κατά τις διαδοχικές γαλουχίες, όπου και οι πιθανότητες για την εμφάνιση μαστίτιδας είναι μεγαλύτερες. Για την εξέταση κάποιας ενδεχόμενης αύξησης των σωματικών κυττάρων γίνεται εκτίμηση των επιπέδων των λευκοκυττάρων (Schultz, 1977).

Ο αριθμός των σωματικών κυττάρων έχει γίνει αντικείμενο πολυάριθμων ερευνών από το 1910. Τα σωματικά κύτταρα αποτελούνται από πολλούς τύπους κυττάρων που περιλαμβάνουν τα ουδετερόφιλα, τα μακροφάγα, τα λεμφοκύτταρα, τα ηωσινόφιλα και διάφορα είδη επιθηλιακών κυττάρων του μαστικού αδένου. Στους μαστούς υγιών γαλακτοπαραγωγών ζώων με αριθμούς σωματικών κυττάρων < 400.000 , οι τύποι κυττάρων, οι οποίοι επικρατούν είναι τα μακροφάγα και τα λεμφοκύτταρα και σε μικρότερα ποσοστά βρίσκονται τα ουδετερόφιλα και τα επιθηλιακά κύτταρα. Εάν παρόλα αυτά η υγεία του μαστικού αδένου επηρεαστεί από κάποια μικροβιακή μόλυνση, ο αριθμός και το είδος των κυρίαρχων τύπων κυττάρων μεταβάλλονται. Η μεταβολή αυτή λαμβάνει χώρα μέσα σε μερικές μόνο ώρες και αποτελεί μέρος της φυσιολογικής άμυνας του οργανισμού έναντι στην είσοδο κάποιου ξενιστή. Η μαστίτιδα ορίζεται ως η φλεγμονή του μαστικού αδένου. Οι υψηλοί αριθμοί των σωματικών κυττάρων στο γάλα δεν αποτελούν την αιτία της μαστίτιδας, αντιθέτως, αυτά είναι απαραίτητα και σχετίζονται με

την απόκριση του μαστικού αδένου στα μικρόβια, η οποία αποτελεί την ανοσολογική απόκριση αυτού στη φλεγμονή (Kehrli & Shuster, 1994).

Όποτε υπάρχει μια παραβίαση του μαστικού αδένου από κάποιο παθογόνο, προκαλείται βλάβη στους ιστούς του μαστού και κατά συνέπεια απελευθερώνεται μια ποικιλία διαφορετικών χημικών ενώσεων. Τα επιθηλιακά κύτταρα είναι αυτά που ξεκινούν τις διαδικασίες για τον περιορισμό του εύρους της μόλυνσης και ενεργοποιούν την ανοσολογική απόκριση του μαστικού αδένου. Τα κυτταρικά συστατικά που κινητοποιούνται κατά την ανοσολογική απόκριση είναι τα λεμφοκύτταρα, τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα, ο ρόλος των οποίων θα μελετηθεί στη συνέχεια (Alhussien & Dang, 2018).

Τα λεμφοκύτταρα

Το ανοσοποιητικό σύστημα είναι το πιο σημαντικό σύστημα, το οποίο συνδέεται με την ανοχή στις ασθένειες. Σε έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί αναφορικά με την μαστίτιδα των βοοειδών έχουν μελετηθεί τόσο οι ειδικοί όσο και οι μη ειδικοί μηχανισμοί άμυνας του ζώου ενάντια στα παθογόνα και οι οποίοι δρουν τόσο περιφερειακά όσο και τοπικά εντός του μαστικού αδένου. Οι μη ειδικοί μηχανισμοί άμυνας περιλαμβάνουν τα φαγοκυτταρικά λευκοκύτταρα (ουδετερόφιλα και μακροφάγα) καθώς επίσης και μια πληθώρα μεσολαβητών (λακτοφερίνη, λακτοϋπεροξειδάση, θειοκυανικό σύστημα του υπεροξειδίου του υδρογόνου, λυσοζύμη κ.α.). Από την άλλη, στους ειδικούς μηχανισμούς άμυνας των ζώων έναντι στην είσοδο των ξενιστών περιλαμβάνονται τα λεμφοκύτταρα και τα αντισώματα. Ο αριθμός, καθώς επίσης και η λειτουργία των λεμφοκυττάρων, επηρεάζονται από την φυσιολογική και παθολογική κατάσταση τόσο του μαστικού αδένου όσο και του ζώου συνολικά (Nonnecke & Harp, 1989).

Τα λεμφοκύτταρα μαζί με τα μακροφάγα που προέρχονται από τα μονοκύτταρα συνήθως συμμετέχουν σε φλεγμονώδεις αποκρίσεις που σχετίζονται με διάφορες μορφές βλάβης των ιστών, οι οποίες μπορεί να κυμαίνονται από την απλή αποκατάσταση ενός τραύματος μέχρι και την φλεγμονώδη-ινοπολλαπλασιαστική απόκριση που σχετίζεται με τις προχωρημένες βλάβες της αθηροσκλήρωσης. Σε ορισμένες περιπτώσεις έχει υποτεθεί ότι η παρουσία T- λεμφοκυττάρων υποδηλώνει κάποιας μορφής ανοσολογική απόκριση σε συνδυασμό με τον τραυματισμό των ιστών. Σε αντίθεση με τα μακροφάγα, τα οποία προέρχονται από τα μονοκύτταρα, η κύρια λειτουργία των T- λεμφοκυττάρων δεν θεωρείται ότι είναι φαγοκυτταρική ή εκκριτική. Αντίθετα ο ρόλος τους θεωρείται ότι

περιλαμβάνει την παραγωγή περιορισμένου αριθμού εκκρινόμενων μορίων και την συμμετοχή τους σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων. Ουσίες όπως η υ-ιντερφερόνη και αρκετές κυτοκίνες πιστεύεται ότι αντιπροσωπεύουν ορισμένα είδη μορίων τα οποία σχηματίζονται δυνητικά από τα T- λεμφοκύτταρα. Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε αποδείχτηκε ότι τα T- λεμφοκύτταρα παράγουν δύο σχετικά ισχυρά ρυθμιστικά μόρια ανάπτυξης, τον αυξητικό παράγοντα HBEGF και τον αυξητικό παράγοντα ινοβλαστών FGF. Η έρευνα αυτή προσέθεσε μία νέα διάσταση στον ρόλο των T- λεμφοκυττάρων, όχι μόνο ως συστατικά της φλεγμονώδους απόκρισης του ανοσοποιητικού, αλλά και ως ίσως εξίσου σημαντικά προηγούμενα της ινοπολλαπλασιαστικής απόκρισης που σχετίζεται με την φλεγμονή (Ross, 1994).

Τα μακροφάγα

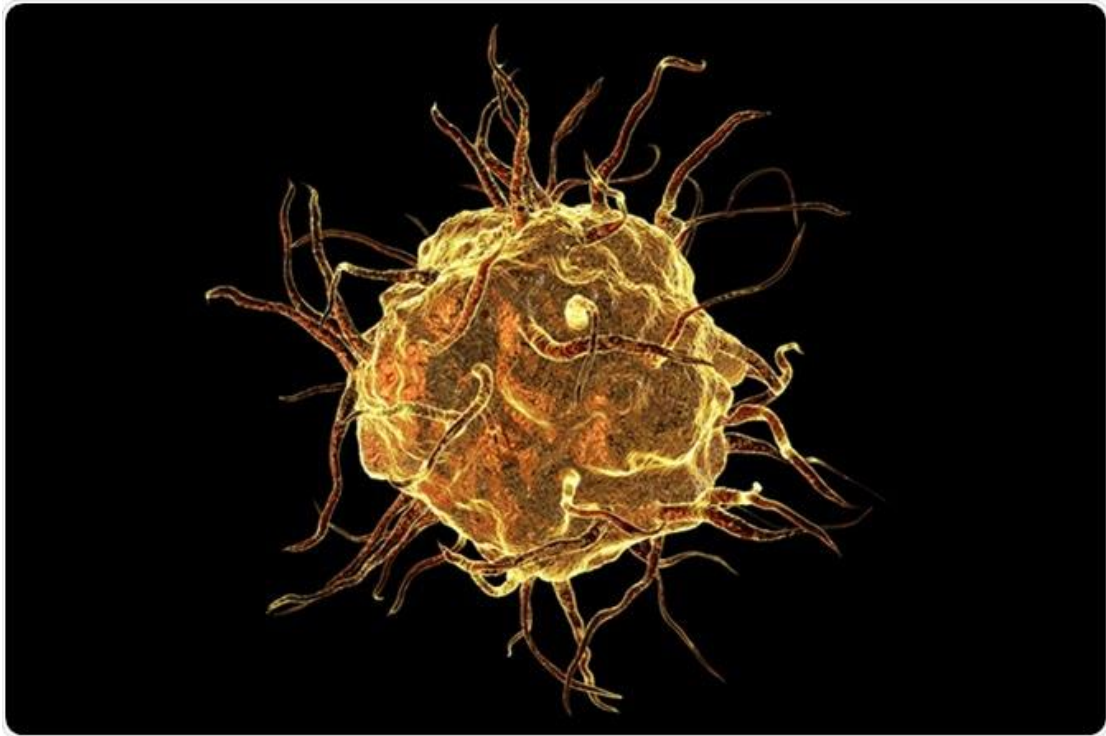
Τα μονοκύτταρα/μακροφάγα προέρχονται από προγονικά κύτταρα στο μυελό των οστών και εισέρχονται στο περιφερειακό αίμα. Κατά τη διάρκεια της ομοιόστασης και της φλεγμονής τα κυκλοφορούντα μονοκύτταρα μεταναστεύουν από τη ροή του αίματος στους ιστούς. Διαφοροποιούνται σε μακροφάγα μετά από έκθεση σε τοπικούς αυξητικούς παράγοντες, προφλεγμονώδεις κυτοκίνες και μικροβιακά προϊόντα. Στις λειτουργίες των μακροφάγων περιλαμβάνονται η φαγοκυττάρωση παθογόνων, μολυσμένων υπολειμμάτων και νεκρών κυττάρων, η παρουσίαση αντιγόνων, η παραγωγή διάφορων τύπων κυτοκινών (όπως των ιντερλευκίνων) και του παράγοντα νέκρωσης όγκου TNF-α κλπ. Επιπλέον διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη φλεγμονώδων ασθενειών όπως ο διαβήτης, ο καρκίνος και η αθηροσκλήρωση.

Η μόλυνση από διάφορα παθογόνα προκαλεί την στρατολόγηση των μονοκυττάρων στα σημεία μόλυνσης προκειμένου να περιοριστεί η περαιτέρω μικροβιακή ανάπτυξη και εισβολή. Αν και τα μακροφάγα είναι απαραίτητα για τον αποτελεσματικό έλεγχο και την κάθαρση των λοιμώξεων, την αφαίρεση των υπολειμμάτων και των νεκρών κυττάρων προάγοντας την επισκευή των ιστών και την επούλωση των πληγών, επιπλέον συμβάλλουν ευεργετικά στη βλάβη και την παθολογία των ιστών κατά τη διάρκεια λοιμώξεων και φλεγμονωδών ασθενειών. Τα μακροφάγα κύτταρα χαρακτηρίζονται από ετερογένεια και ο φαινότυπος και οι λειτουργίες τους ρυθμίζονται από το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται (Sharouri-Moghaddam et al., 2018).

Τα μακροφάγα συνήθως υπάρχουν σε δύο διακριτές υποομάδες. Η πρώτη υποομάδα αποτελεί τα M1 μακροφάγα τα οποία είναι προ-φλεγμονώδη και πολωμένα από κάποιον

λιποπολυσακχαρίτη είτε μόνα τους είτε σε συνδυασμό με κυτοκίνες, όπως η IFN- γ και παράγουν προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως οι ιντερλευκίνες (όπως η TNF- α). Από την άλλη υπάρχουν τα M2 μακροφάγα τα οποία ασκούν τόσο αντιφλεγμονώδη όσο και ανοσορυθμιστική δράση, είναι πολωμένα από κυτοκίνες (όπως η IL-4 και η IL-13) και παράγουν αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως η TGF- β . Τόσο τα μακροφάγα M1 όσο και τα M2 διαθέτουν μοναδικές ικανότητες καταστρέφοντας τα παθογόνα και επιδιορθώνοντας τραυματισμούς που οφείλονται σε φλεγμονές. Όταν μία μόλυνση ή φλεγμονή είναι τόσο σοβαρή, ώστε να θέσει σε κίνδυνο την υγεία ενός οργάνου, τα μακροφάγα αρχικά ενεργοποιούν τον φαινότυπο M1 προκειμένου να απελευθερώσει την TNF- α και άλλες ιντερλευκίνες. Παρόλα αυτά, εάν η φάση αυτή των M1 μακροφάγων συνεχιστεί μπορεί να προκληθεί ζημιά στους ιστούς. Για αυτό το λόγο τα μακροφάγα τότε ενεργοποιούν το φαινότυπο M2, ο οποίος έχει ως αποτέλεσμα την έκκριση της TGF- β και άλλων για την καταστολή της φλεγμονής, τη συμβολή στην επιδιόρθωση ιστών, την αναδιαμόρφωση, την αγγειογένεση και την διατήρηση της ομοιόστασης (Sharougi-Moghaddam et al., 2018).

Τα μακροφάγα (Εικόνα 3.1) διαφέρουν μορφολογικά και φαινοτυπικά στα όργανα, όπως το συκώτι, ο σπλήνας, ο πνεύμονας, το έντερο και ο εγκέφαλος και αλληλοεπιδρούν με τη μεσοκυττάρια ουσία και άλλους τύπους κυττάρων. Είναι ενεργά κατά τη βιοσύνθεση και εκφράζουν ένα ευρύ φάσμα υποδοχέων, αναγνωρίζοντας τα ξένα, τα φυσιολογικά αλλά και τα μη φυσιολογικά κύτταρα, καθώς επίσης και τα προϊόντα που προέρχονται από τον ξενιστή. Μέσω της φαγοκυττάρωσης και της έκκρισης διάφορων προϊόντων συμπεριλαμβανομένων των κυτοκινών, διάφορων αυξητικών παραγόντων και μεταβολιτών συμβάλλουν στην αναδόμηση των ιστών, στην άμυνα του ξενιστή καθώς επίσης και στη φυσική και επίκτητη ανοσία σε πολλές ασθένειες του οργανισμού-ξενιστή (Gordon S. & Martinez F.O., 2010).



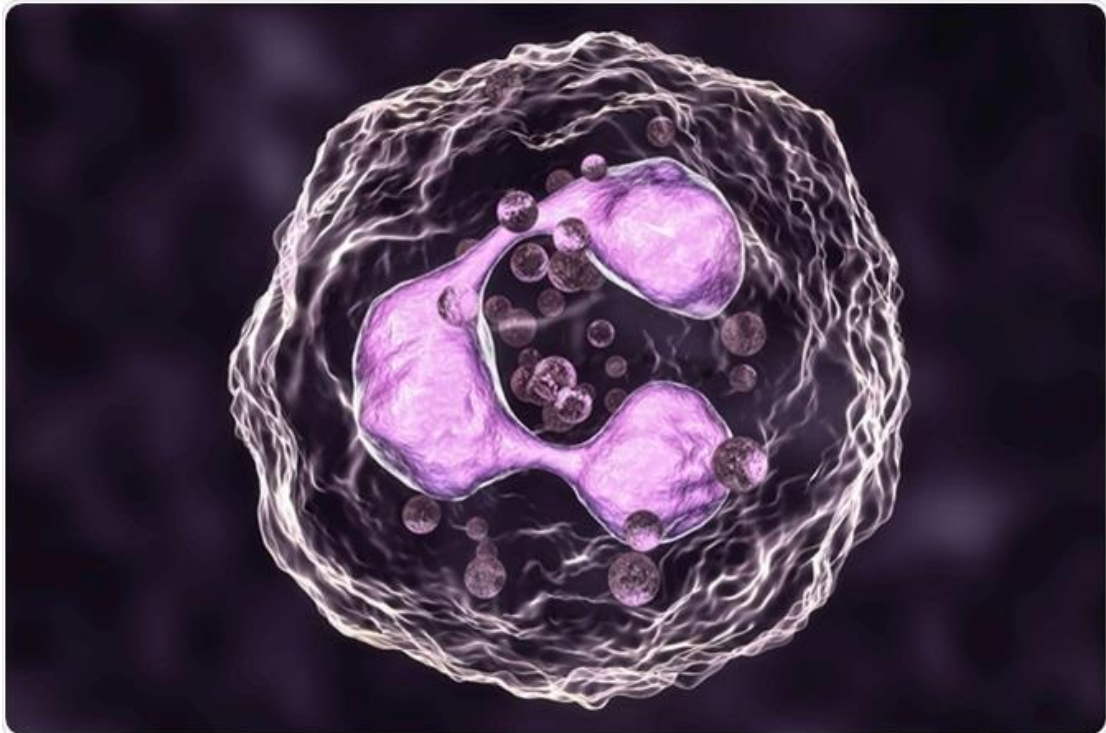
Εικόνα 3.1. Τρισδιάστατη απεικόνιση του μακροφάγου (Surat, 2022).

Τα ουδετερόφιλα/πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα

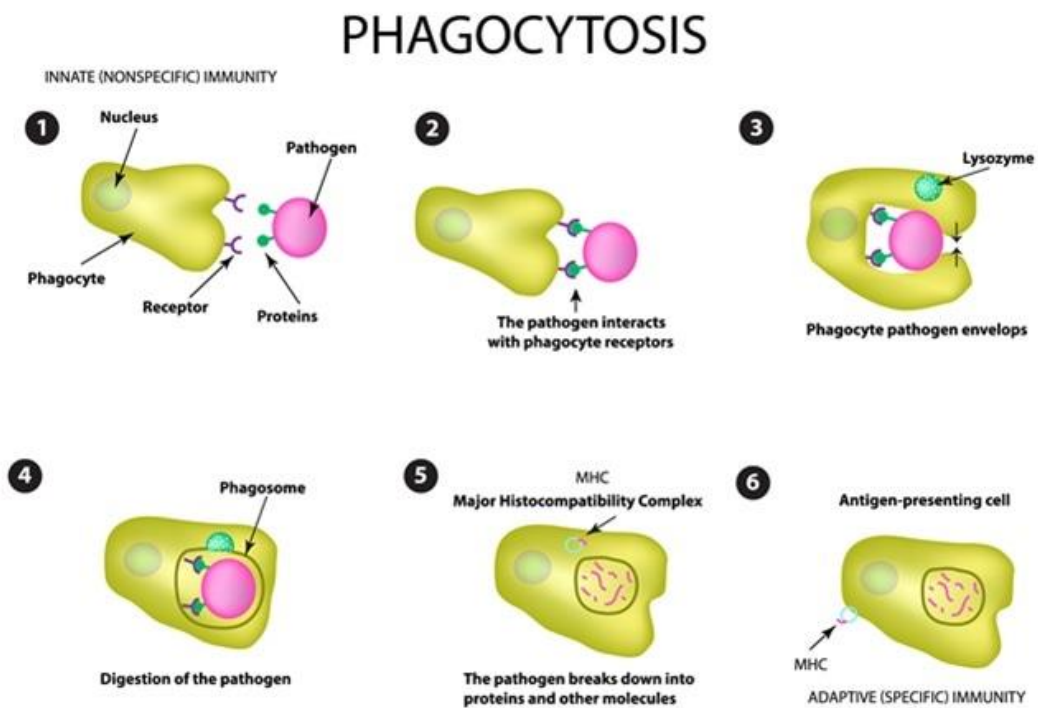
Τα ουδετερόφιλα (Εικόνα 3.2) αντιπροσωπεύουν την κύρια γραμμή άμυνας του σώματος έναντι σε εισβάλλοντα παθογόνα όπως τα βακτήρια, αποτελούν το 40-60% του πληθυσμού των λευκών αιμοσφαιρίων (Wright. et al., 2010) και παράγονται στο μυελό των οστών σε μεγάλους αριθμούς. Υπό συνθήκες ομοιόστασης τα ουδετερόφιλα εισέρχονται στην κυκλοφορία, μεταναστεύουν στους ιστούς όπου ολοκληρώνουν τις λειτουργίες τους και τελικά εξαλείφονται από τα μακροφάγα σε περίοδο μιας ημέρας. Αποτελούν τελεστικά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος καθώς περιπολούν συνεχώς τον οργανισμό για σημάδια μικροβιακών λοιμώξεων και όταν αυτά εντοπιστούν τα κύτταρα αυτά ανταποκρίνονται γρήγορα στην παγίδευση και στην θανάτωση των εισβαλόντων παθογόνων. Οι τρεις κύριες αντιμικροβιακές λειτουργίες για τις οποίες είναι υπεύθυνες τα ουδετερόφιλα είναι η φαγοκυττάρωση, η αποκοκκίωση και η απελευθέρωση υλικού από τον πυρήνα με τη μορφή εξωκυτταρικών παγίδων ουδετερόφιλων (NETs). Αν και μέχρι πρότινος αυτές θεωρούνταν οι μοναδικές λειτουργίες των ουδετερόφιλων πλέον έχει αποδειχτεί ότι τα κύτταρα αυτά δεν συμβάλλουν μόνο στην θανάτωση των μικροοργανισμών. Πιο συγκεκριμένα, τα ουδετερόφιλα είναι υπεύθυνα για την παραγωγή πολλών κυτοκινών και άλλων

αντιφλεγμονωδών παραγόντων που επηρεάζουν και ρυθμίζουν την φλεγμονή και το ανοσοποιητικό σύστημα. Επιπλέον, τα κύτταρα αυτά ρυθμίζουν τις δραστηριότητες των γειτονικών κυττάρων, συμβάλλουν στην αντιμετώπιση της φλεγμονής, ρυθμίζουν την ανοσολογική απόκριση των μακροφάγων, συμμετέχουν ενεργά σε διάφορες ασθένειες όπως ο καρκίνος και επίσης έχουν κάποιο ρόλο στην έμφυτη ανοσολογική μνήμη. Επιπροσθέτως, τα ουδετερόφιλα παρουσιάζουν διάφορους φαινότυπους από τη στιγμή που εξέρχονται του μυελού των οστών και εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος μέχρι τη στιγμή που απομακρύνονται από αυτή. Η αλλαγή αυτή στους φαινότυπους είναι γνωστή ως γήρανση καθώς πραγματοποιείται σε διάστημα μίας ημέρας μέχρι τον θάνατο του κάθε κυττάρου (απόπτωση) και οδηγεί σε διάφορα ουδετερόφιλα με διακριτές ιδιότητες. Επιπλέον το μικροπεριβάλλον των διάφορων ιστών μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τα ουδετερόφιλα να αποκτήσουν εξειδικευμένες λειτουργίες. Συνεπώς οι διαφορετικοί αυτοί φαινότυποι μπορεί να οδηγήσουν στην ύπαρξη πολλών υποομάδων ουδετερόφιλων (Rosales, 2018).

Μόλις τα ουδετερόφιλα εξέλθουν από την κυκλοφορία, περνούν μέσω του ενδοθηλίου και εγκαθίστανται στον ιστό που υφίστανται φλεγμονή. Εν συνεχεία η έκθεση των ουδετερόφιλων σε χημειοελκτικά έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ψευδοποδιών στην άκρη του κυττάρου. Στο σημείο της φλεγμονής οι υποδοχείς πρωτεϊνών και ανοσογλοβουλίνων αναγνωρίζουν τα βακτήρια, σχηματίζουν ψευδοπόδια, φαγοκυτταρώνουν το παθογόνο και το καταστρέφουν (Εικόνα 3.3). Τα ουδετερόφιλα διαθέτουν πρωτεάσες σαν όπλο τους γεγονός που συμβάλλει στη θανάτωση των φαγοκυτταρωμένων παθογόνων (Wright. et al., 2010).



Εικόνα 3.2. Τρισδιάστατη απεικόνιση του ουδετερόφιλου (Surat, 2022).



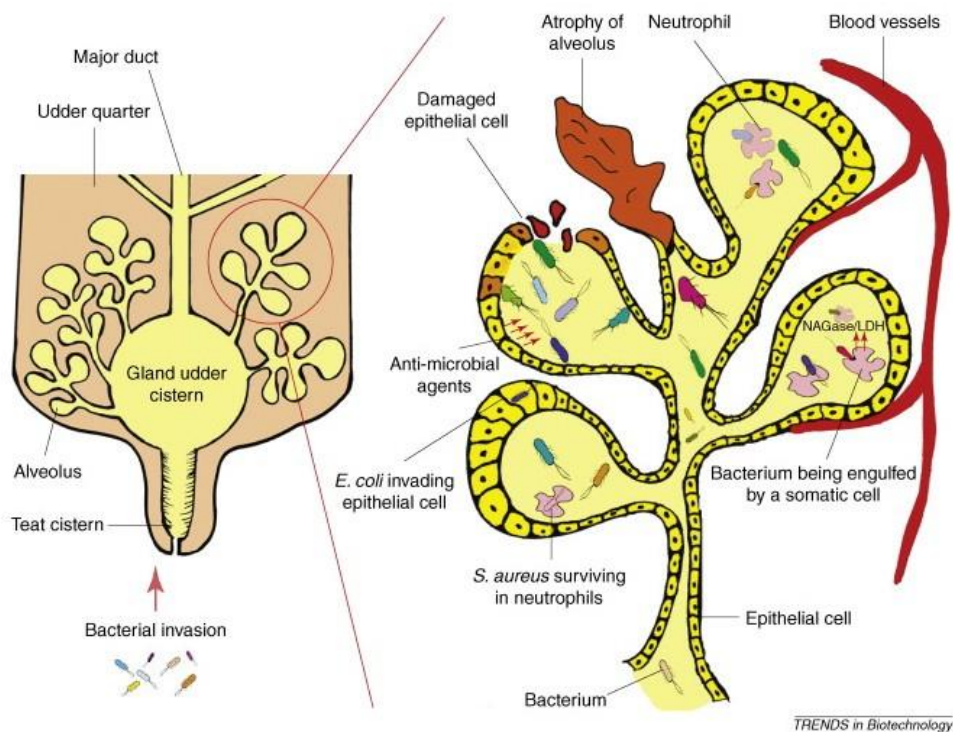
Εικόνα 3.3. Η διαδικασία της φαγοκυττάρωσης των παθογόνων (Surat, 2022).

3.3 Εισβολή των βακτηρίων στον μαστό και εγκατάσταση της μόλυνσης

Η ενδομαστική λοίμωξη προκύπτει όταν βακτήρια περάσουν από τον αγωγό της θηλής ενός τεταρτημορίου του μαστού, πολλαπλασιαστούν στην θηλή και προχωρήσουν στους ιστούς που παράγουν γάλα. Οι μικροοργανισμοί αυτοί διαπερνούν τον αγωγό της θηλής με ποικίλους τρόπους κατά τη διαδικασία του αρμέγματος αλλά και μη. Για παράδειγμα κατά την άμελξη του ζώου με αμελκτική μηχανή οι μικροοργανισμοί μπορούν να προωθηθούν μέσω του αγωγού της θηλής στη δεξαμενή της θηλής μέσω των κρούσεων σταγονιδίων που προκαλούνται από τη μηχανή αρμέγματος που μπορεί να συμβούν προς το τέλος του αρμέγματος που ο όγκος του υγρού στο μαστό μειώνεται. Επίσης, κατά την μηχανική άμελξη οι κάτω επιφάνειες του δέρματος της θηλής εκτίθενται σε τυχόν μεταδοτικά βακτήρια τα οποία μπορεί να παραμείνουν στις επενδύσεις των κυπέλλων της θηλής από ζώα που αρμέχτηκαν πρωτύτερα. Αμέσως μετά την αφαίρεση των κυπέλλων από τις θηλές τα μολυσματικά αυτά βακτήρια παραμένουν στα υπολείμματα γάλακτος, συγκεντρώνονται στο άνοιγμα της θηλής, ευρισκόμενα σε ιδανική θέση για την πρόκληση λοίμωξης. Οι μικροοργανισμοί μπορούν να εισέλθουν μέσω του πόρου της θηλής όταν αυτά υποβάλλονται σε θεραπεία με τη διαδικασία της ενδομαστικής έκχυσης. Επιπλέον, η πιθανότητα βακτηριακής εισβολής αυξάνεται σημαντικά από βακτήρια που κατοικούν ή αποικίζουν στο δέρμα της θηλής, στο στόμιο της θηλής και τον πόρο της θηλής όπως ο *S. aureus* και ορισμένοι σταφυλόκοκκοι (Akers. & Nickerson., 2011).

Εφόσον οι μικροοργανισμοί διαρρήξουν τον πόρο της θηλής και τους κοιλιακούς χώρους του μαστού η προσκόλληση των βακτηρίων στους ιστούς που επενδύουν το εσωτερικό του μαστικού αδένου μπορεί να επηρεάσει την ικανότητα τους να παραμείνουν εκεί ειδικά κατά τη φάση της γαλουχίας όταν το περιεχόμενο του μαστού ξεπλένεται περιοδικά κατά τη διάρκεια κάθε αρμέγματος (έως και 4 φορές την ημέρα). Ο *S. aureus* και ο *S. agalactiae* προσκολλώνται καλά στους ιστούς που επενδύουν τους χώρους συγκέντρωσης του γάλακτος ενώ από την άλλη το *Escherichia coli* εκτός από το ότι προσκολλάται παράλληλα πολλαπλασιάζεται. Τα προαναφερθέντα βακτήρια προκαλούν βλάβες στους ιστούς που επενδύουν του χώρους συγκέντρωσης του γάλακτος στο μαστό και στη συνέχεια προχωρούν στους αγωγούς και στις κυψελίδες όπου και πολλαπλασιάζονται (Εικόνα 3.4). Η αλληλεπίδραση των βακτηρίων με τα λευκοκύτταρα του γάλακτος είναι αυτή που επηρεάζει την εγκατάσταση της μόλυνσης. Στο γάλα των υγιών μαστικών

αδένων ο κυρίαρχος τύπος κυττάρων είναι τα μακροφάγα, τα οποία χρησιμεύουν ως φρουροί για την ανίχνευση παθογόνων που εισέρχονται στον οργανισμό. Μετά την ανίχνευση των βακτηρίων τα μακροφάγα απελευθερώνουν χημειοελκτικά που στρατολογούν τα πολυμορφόπυρνα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα από την περιοχή της μόλυνσης. Τα λευκοκύτταρα πολλαπλασιάζονται και αρχικά συσσωρεύονται γύρω από τις κυψελίδες με σκοπό να μεταναστεύσουν μέσω του κυψελιδικού αγωγού και του κοιλιακού αυλού και έτσι να έρθουν σε επαφή και να εξουδετερώσουν τα εισβάλλοντα παθογόνα. Η φλεγμονή που προκύπτει ως απόκριση της παρουσίας βακτηρίων ξεκινά με την απελευθέρωση ιντερφερονών, ιντερλευκίνων και του παράγοντα νέκρωσης όγκου TNF-α (Akers. & Nickerson., 2011).



Εικόνα 3.4. Είσοδος του μικροβίου στο μαστό και πρόκληση της μόλυνσης (Viguiet et al., 2009).

4. Προσδιορισμός τους είδους των σωματικών κυττάρων - Λίγα λόγια για την κυτταρομετρία ροής

Η κυτταρομετρία ροής είναι μία μέθοδος, μέσω της οποίας επιτυγχάνεται η παρατήρηση, η ποσοτικοποίηση και ο διαχωρισμός μικροσκοπικών σωματιδίων (π.χ. κυττάρων), τα οποία αιωρούνται σε μία ροή υγρού. Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της κυτταρομετρίας ροής είναι ότι επιτρέπει την ταυτόχρονη μέτρηση πολλαπλών χαρακτηριστικών (φυσικών και χημικών) σε ένα μόνο κύτταρο. Στην κυτταρομετρία ροής οι μετρήσεις γίνονται σε μεμονωμένα κύτταρα, καθώς αυτά βρίσκονται σε διάλυμα, κινούνται σε ένα ρεύμα με σταθερή ταχύτητα και ρέουν μέσα σε μία συσκευή ανίχνευσης οπτικών και ηλεκτρονικών σημάτων (Λιαδάκη, 2016).

Βάσει της κυτταρομετρίας ροής είναι δυνατόν να αναλυθούν μεμονωμένα κύτταρα ή αιωρούμενα σωματίδια σε ένα ρυθμισμένο αλατούχο διάλυμα καθώς διέρχονται μέσα από μία ή περισσότερες δέσμες φωτός. Το οπτικο-ηλεκτρονικό σύστημα που διαθέτει καταγράφει τα διερχόμενα από το laser κύτταρα-μικροσωματίδια και με βάση τη σκέδαση του φωτός και το φθορισμό παρέχονται πληροφορίες σχετικά με χαρακτηριστικά τους, όπως μέγεθος και φυσικοχημικές ιδιότητες. Ο τρόπος λειτουργίας της κυτταρομετρίας ροής παρέχει τη δυνατότητα για μια λεπτομερή ανάλυση σύνθετων πληθυσμών σε σύντομη χρονική περίοδο. Συνεπώς, μέσω του κυτταρομετρητή ροής είναι δυνατόν να αποτυπωθεί η εικόνα πολλαπλών κυττάρων ή σωματιδίων και να γίνει η ανάλυση ταυτόχρονα πολλών διαφορετικών παραμέτρων. Η μέθοδος της κυτταρομετρίας ροής έχει ένα ιδιαίτερα ευρύ φάσμα εφαρμογών σε πολλούς επιστημονικούς τομείς, όπως της μοριακής βιολογίας, της ιατρικής, της μηχανικής και της γενετικής (Μπουρνάκας, 2021).

Επιπλέον, η μέθοδος αυτή βρίσκει εφαρμογή και σε άλλους τομείς, όπως η βιολογία του καρκίνου, η ανοσολογία, η ιολογία, καθώς επίσης και η παρακολούθηση μολυσματικών ασθενειών. Πιο συγκεκριμένα, η ίδια αποτελεί ένα πολύ αποτελεσματικό μέσο για τη μελέτη του ανοσοποιητικού συστήματος και της ανοσοποιητικής απόκρισης σε μολυσματικές ασθένειες και τον καρκίνο. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει τον ταυτόχρονο χαρακτηρισμό μεικτών πληθυσμών κυττάρων αίματος και μυελού των οστών, όπως επίσης και συμπαγών ιστών που μπορούν να διασπαστούν σε μεμονωμένα κύτταρα όπως οι κόμβοι λέμφου, η σπλήνα, βλεννογόνοι ιστοί, συμπαγείς όγκοι κλπ. Εκτός από την ανάλυση πληθυσμών κυττάρων, μία ακόμη εφαρμογή της κυτταρομετρίας ροής είναι η

ταξινόμηση των κυττάρων σε ομοιόμορφους πληθυσμούς προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω και μεταγενέστερη ανάλυση. Τα όργανα που χρησιμοποιούνται για την εφαρμογή της συγκεκριμένης μεθόδου έχουν εξελιχθεί σημαντικά τις τελευταίες δεκαετίες και έχουν σχεδιαστεί ώστε να εξυπηρετούν συγκεκριμένους ερευνητικούς σκοπούς (McKinnon, 2018).

4.1 Πλεονεκτήματα της μεθόδου

Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου περιλαμβάνεται η πολύ μεγάλη ταχύτητα των μετρήσεων καθώς υπάρχει η δυνατότητα να μετρώνται έως και 10.000 κύτταρα ανά δευτερόλεπτο και στη συνέχεια να αναλύονται ένα προς ένα και έτσι να ελέγχεται η ετερογένεια ενός κυτταρικού πληθυσμού. Επιπλέον, η μέθοδος της κυτταρομετρίας χαρακτηρίζεται από υψηλή επαναληψιμότητα καθώς επίσης και από την πολυπαραμετρική της φύση. Πιο συγκεκριμένα, παρέχεται η δυνατότητα μέσω αυτής να αναλύονται πολλοί ανεξάρτητοι παράμετροι στο ίδιο κύτταρο, όπως για παράδειγμα ο ταυτόχρονος προσδιορισμός δύο ή περισσότερων κυτταρικών δεικτών με βάση τον πρόσθιο και πλάγιο σκεδασμό και τη χρήση δύο τουλάχιστον φθοριοχρωμάτων. Ακόμη, η μέθοδος της κυτταρομετρίας χαρακτηρίζεται από μεγάλη αναλυτική ικανότητα και αξιοπιστία σε σύγκριση με την μικροσκοπία, όπως επίσης ακρίβεια και ευαισθησία. Επίσης, αξίζει να αναφερθεί ότι διαθέτει την ικανότητα να ανιχνεύει ακόμη και μικρούς αριθμούς μορίων ανά κυτταρική επιφάνεια (μέχρι και 3.000-5.000 μόρια). Επιπροσθέτως, αναφορικά με το προς ανάλυση δείγμα η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μία μέθοδο που απαιτεί ελάχιστη ποσότητα δείγματος αλλά και η προετοιμασία αυτού του δείγματος που απαιτείται είναι σχετικά εύκολη. Τέλος, στα πλεονεκτήματα αυτής περιλαμβάνεται και το γεγονός ότι τα αποτελέσματα αποτυπώνονται και αποθηκεύονται στη μνήμη του υπολογιστή και η ανάκληση και εκτύπωση αυτών μπορεί να γίνει οποιαδήποτε χρονική στιγμή (Ταπάρκου, 2005).

4.2 Ιστορική αναδρομή

Το 1954 δημιουργήθηκε το πρώτο όργανο με τη βοήθεια του οποίου πραγματοποιήθηκε μια ηλεκτρονική μέτρηση κυττάρων και η εκτίμηση του μεγέθους σε κύτταρα τα οποία

έρεαν σε ένα αγωγίμο υγρό με ένα κύτταρο τη φορά να διέρχεται από το σημείο μέτρησης. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε από τον Wallace Coulter. Το όργανο αυτό αποτέλεσε τη βάση του πρώτου βιώσιμου αναλυτή ροής. Στη συνέχεια, το 1965 οι Kamensky et al., περιέγραψαν έναν κυτταρομετρητή ροής δύο παραμέτρων που μετρούσε την απορρόφηση και τον οπίσθιο σκεδασμένο φωτισμό μη χρωματισμένων κυττάρων και χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του μεγέθους των κυττάρων και της περιεκτικότητας αυτών σε νουκλεϊκό οξύ. Το όργανο αυτό αντιπροσώπευε τον πρώτο κυτταρομετρητή ροής πολλαπλών παραμέτρων και ο πρώτος αυτός διαλογέας κυττάρων περιγράφηκε το ίδιο έτος από τον Fulwyler. Η χρήση μίας ηλεκτροστατικής τεχνικής εγγραφής εκτροπής με έγχυση μελάνης παρείχε τη δυνατότητα στο όργανο να ταξινομεί τα κύτταρα με ρυθμό 1000 κύτταρα ανά δευτερόλεπτο. Αργότερα, το 1967, ο Thompson ανέπτυξε ένα σύστημα για την ηλεκτροστατική φόρτιση σταγονιδίων που ενίσχυσε την ανάπτυξη διαλογέων κυττάρων. Οι Van Dilla et al. εκμεταλλεύτηκαν τις διαφορές όγκου μεταξύ των κυττάρων για να παρασκευάσουν εναιωρήματα με περιεκτικότητα υψηλότερη από 95% σε κοκκιοκύτταρα και λεμφοκύτταρα. Το 1983 εισήχθησαν τα πρώτα κλινικά κυτταρόμετρα ροής. Ακολούθως, το 1990, παράλληλα με τις προόδους που συνέβησαν στην τεχνολογία και την δημιουργία ισχυρών και παράλληλα φτηνών υπολογιστών, η κυτταρομετρία ροής βρήκε καθημερινή χρήση και αναπτύχθηκαν όργανα πάγκου που περιλάμβαναν κλειστές κυψέλες ροής. Εν συνεχεία, το 1995 η δυνατότητα μέτρησης τουλάχιστον πέντε παραμέτρων σε 25.000 κύτταρα ανά δευτερόλεπτο χρησιμοποιούνταν τακτικά για την βελτίωση της διάγνωσης και της διαχείρισης διάφορων καταστάσεων των νόσων καθώς επίσης και για την κατανόηση της παθογένειας της νόσου. Το 1999, τα όργανα ήταν πλέον εξοπλισμένα με λέιζερ και ικανά να αναλύουν έντεκα φθοροχρώματα τα οποία δημιουργήθηκαν από τους Bigos et al. Τέλος, το 2003 εισήχθησαν διαλογείς υψηλής ταχύτητας που χρησιμοποιούν την ψηφιακή τεχνολογία (Macey, 2007).

4.3 Τα μέρη του οργάνου

Τα όργανα ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες, σε αυτά που ονομάζονται διαλογής και στα όργανα μη διαλογής. Ο τύπος οργάνων διαλογής παρέχει τη δυνατότητα ταξινόμησης σημασμένων με φθορισμό κυττάρων από ένα μεικτό πληθυσμό κυττάρων. Ένας κυτταρομετρητής ροής αποτελείται από ένα σύστημα ροής υγρών, από ένα οπτικό (διέγερσης και συλλογής) και ένα ηλεκτρονικό σύστημα. Το σύστημα ροής υγρών είναι

υπεύθυνο για την κατεύθυνση του υγρού που περιέχει τα σωματίδια στην εστιασμένη πηγή φωτός με αποτέλεσμα κατά την πρόσπτωση της φωτεινής δέσμης σε κάθε μεμονωμένο σωματίδιο/κύτταρο να επιτυγχάνεται η μέτρηση των διάφορων παραμέτρων του (Ταπάρκου, 2005). Το οπτικό σύστημα διέγερσης από την άλλη εστιάζει την πηγή φωτός στα κύτταρα/σωματίδια ενώ το οπτικό σύστημα συλλογής εκπέμπει τη σκέδαση φωτός ή το φθορίζον φως του σωματιδίου σε ένα ηλεκτρονικό δίκτυο. Το ηλεκτρονικό σύστημα ανιχνεύει το σήμα και το μετατρέπει σε ψηφιακά δεδομένα που είναι ανάλογα με την ένταση του φωτός και ο υπολογιστής επίσης απαιτείται να αναλύσει τα δεδομένα αυτά (Adan et al., 2016).

5. Τα αντιβιοτικά ως αυξητικοί παράγοντες

Η εξέλιξη στην παραγωγή των αντιβιοτικών καθώς και η αποτελεσματικότητα στις αποδόσεις των ζώων είχε ως συνέπεια την εντατική χρήση αυτών των ουσιών. Τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται ως παράγοντες ανάπτυξης στην παραγωγή, εδώ και σχεδόν 50 χρόνια. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια είναι έντονη η ευαισθητοποίηση του κοινού αναφορικά με τους κινδύνους της παρατεταμένης χρήσης αυτών στην υγεία καθώς και τις αρνητικές επιπτώσεις στο περιβάλλον από την υπερβολική χρήση συνθετικών φαρμάκων συμπεριλαμβανομένων των αντιβιοτικών εντός των ζωοτροφών σαν αυξητικούς παράγοντες και σαν ορμόνες ανάπτυξης. Επιπλέον, η προτίμηση του καταναλωτικού κοινού για τα βιολογικά προϊόντα έχει αλλάξει τη στάση αυτού απέναντι στα συνθετικά αντιβιοτικά. Είναι γεγονός πως μέσω ερευνών έχει προκύψει έντονη ανησυχία σχετικά με την μικροβιακή αντοχή μεταξύ των ανθρώπινων παθογόνων λόγω της συνεχούς χρήσης αντιβιοτικών σαν ενισχυτές αποδόσεων σε ζώα με αποτέλεσμα την απαγόρευση της χρήσης αυτών στην διατροφή των ζώων από τις αρχές του 2000. Η εξάλειψη αυτών από την διατροφή των ζώων είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της συχνότητας των λοιμώξεων από παθογόνους μικροοργανισμούς με συνέπεια την μείωση των αποδόσεων των ζώων. Ως εκ τούτου η τάση εύρεσης εναλλακτικών διαθέσιμων λύσεων έχει αυξηθεί (Gheisar & Kim, 2017).

5.1 Οι πρόσθετες ύλες έναντι των αντιβιοτικών

Οι πρόσθετες ύλες ζωοτροφών χρησιμοποιούνται σαν διεγερτικά της ανάπτυξης στη ζωική παραγωγή εδώ και αρκετές δεκαετίες. Είναι γεγονός, πως καταβλήθηκε μεγάλη προσπάθεια προκειμένου να βρεθούν διατροφικά πρόσθετα με σκοπό την αντικατάσταση των αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνταν μέχρι πρότινος, μετά την απαγόρευση της χρήσης αυτών στη ζωική παραγωγή, από την Ευρωπαϊκή Ένωση, το 2006. Ο ρόλος των αντιβιοτικών σαν πρόσθετα σχετίζονταν με τη ρύθμιση της μικροχλωρίδας στον γαστρεντερικό σωλήνα των ζώων μέσω του ελέγχου της ανάπτυξης ανεπιθύμητων και επιβλαβών μικροοργανισμών και των τοξινών τους.

Το ενδιαφέρον για φυσικούς παράγοντες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο για την πρόληψη όσο και για τη θεραπεία των ζώων έχει αυξηθεί σε μεγάλο βαθμό. Η ζωική παραγωγή συνδέεται στενά με τη διατροφή και την υγεία του καταναλωτή. Εντερικά

παθογόνα ζώων, όπως τα *Campylobacter*, *Salmonella*, *Listeria*, and *Yersinia* αποτελούν άμεση πηγή μόλυνσης των τροφίμων και αιτία ζωνόσων. Μία από τις μεθόδους αύξησης της παραγωγικότητας των ζώων με φυσικό τρόπο είναι η προσθήκη προβιοτικών, δηλαδή ζωντανών μικροοργανισμών που είναι συμβιωτικοί με την φυσιολογική εντερική μικροχλωρίδα. Τα προβιοτικά, τα πρεβιοτικά και συμβιωτικά έχουν αποδειχτεί αποτελεσματικά τόσο σε νεαρά ζώα όσο και σε νεογνά. Η επίδραση αυτών είναι ευεργετική και αφορά στη σταθερότητα αλλά και την προστασία του εντερικού οικοσυστήματος. Τα βακτήρια που αποικίζουν στην πεπτική οδό διαδραματίζουν έναν διπλό ρόλο, καθώς ασκούν θετική επίδραση στον βλεννογόνο ενώ ταυτοχρόνως ενεργοποιούν αμυντικούς μηχανισμούς για την ενίσχυση της ανοσολογικής απόκρισης και τη διατήρηση της ομοιόστασης. Επιπλέον, επηρεάζουν τις μεταβολικές και πεπτικές διεργασίες.

Τα τελευταία χρόνια, πολλοί επιστήμονες παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον προς τη χρήση των φυτοβιοτικών τα οποία περιέχουν πολλές βιολογικά ενεργές ουσίες είτε βιοενεργές ενώσεις οι οποίες παραλαμβάνονται από τα φυτά π.χ. αλκαλοειδή, σαπωνίνες, τερπένια, γλυκοσίδες, φωσφορυλιωμένα αλκαλοειδή και παράγωγα τριτερπενίων όπως επίσης και ενώσεις όπως η θυμόλη, η καρβακρόλη, η κινναμαλδεΰδη, η καψαϊκίνη, η ευγενόλη κλπ. Οι βιοενεργές ενώσεις που περιέχονται σε αυτά αυξάνουν τη γευστικότητα της τροφής και διεγείρουν την όρεξη. Επιπλέον ως ρυθμιστές των πεπτικών λειτουργιών επηρεάζουν την γαστρεντερική κινητικότητα και την έκκριση των πεπτικών υγρών, μειώνουν την εμφάνιση διάρροιας και ρυθμίζουν την τιμή του pH στον γαστρεντερικό σωλήνα. Επιπροσθέτως, μπορούν να δράσουν ως προστατευτικοί παράγοντες και ρυθμιστές του μεταβολισμού. Ορισμένες φυτικές πρώτες ύλες παρουσιάζουν αναβολικές, αντιστρεσογόνες και αναληπτικές ιδιότητες και μπορούν ακόμη και να μετριάσουν τις αρνητικές επιδράσεις των αντιδιαιτητικών παραγόντων που περιέχονται στις ζωοτροφές (Bakowski & Kiczorowska, 2020).

6. Γενικά για τα φυτοβιοτικά

Τα φυτοβιοτικά, τα οποία είναι φυτικές βιοενεργές ενώσεις έχουν χρησιμοποιηθεί στην ιατρική καθώς και τη ζωική παραγωγή για την πρόληψη ασθενειών, για την αύξηση της αντίστασης αυτών έναντι των λοιμώξεων αλλά και τη βελτίωση των αποδόσεων των ζώων (Πίνακας 6.1). Τα φυτοβιοτικά, χρησιμοποιούνται σε μεγάλο βαθμό στη διατροφή των μηρυκαστικών, λόγω της αντιμικροβιακής τους δράσης, όπως επίσης και για τον περιορισμό των εκπομπών μεθανίου αλλά και για την βελτίωση της ζυμωτικότητας της τροφής των μηρυκαστικών. Εκτός από την αντιμικροβιακή τους δράση, πολλά στοιχεία έχουν δείξει ότι τα φυτοβιοτικά διαθέτουν, επίσης, ισχυρή αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση. Επιπλέον, έχει αποδειχτεί ότι η συνεργιστική δράση μεταξύ φυτοβιοτικών είναι υπεύθυνη για τις ισχυρές τους ιδιότητες οι οποίες βελτιώνουν την υγιεινή κατάσταση των ζώων. Συνεπώς, συνδυασμοί φυτοβιοτικών με πιθανή συνεργιστική δράση προτιμώνται με σκοπό την πρόληψη οξειδωτικών διεργασιών που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες. Επιπροσθέτως, πέραν της αντιμικροβιακής τους δράσης χαρακτηρίζονται επίσης από αντιιική και αντιμυκητησιακή δράση ενώ στα πλεονεκτήματα της χορήγησης τους περιλαμβάνονται και το μικρό ρίσκο αλλεργικής αντίδρασης καθώς επίσης και η ευκολία αλλά και η αποτελεσματικότητα της χορήγησης αυτών. Αναφορικά, σε μελέτη που πραγματοποίησαν οι Hashemzadeh-Cigari et al. (2014), παρατηρήθηκε ότι η χορήγηση μίγματος φυτοβιοτικών σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης της φυλής Holstein είχε θετική επίδραση τόσο στη μείωση των σωματικών κυττάρων στο γάλα όσο και στην παραγωγικότητα των ζώων (Hashemzadeh-Cigari et al., 2014). Ακόμη τα φυτοβιοτικά έχει αποδειχτεί ότι μπορούν να βελτιώσουν την ποιότητα των προϊόντων που προέρχονται από τα ζώα στον οποίων την διατροφή, έχουν συμπεριληφθεί (Windisch et al., 2008).

Πίνακας 6.1. Τα πιο κοινώς χρησιμοποιούμενα φυτοβιοτικά (Gheisar and Kim, 2017).

Latin name	Common name	Parts/products used
<i>Achillea millefolium</i> s.l.	Yarrow	Infusion
<i>Arnica montana</i>	Arnica	Extract
<i>Boswellia sacra</i>	Frankincense	Resin
<i>Carum carvi</i>	Caraway	Seed, essential oil
<i>Citrus</i> sp.	Citrus oil	Essential oil
<i>Curcuma longa</i>	Curcuma	Rhizome
<i>Foeniculum vulgare</i>	Fennel	Seed
<i>Matricaria recutita</i>	Camomile	Infusion, essential oil
<i>Mentha</i> sp.	Mint	Infusion, essential oil
<i>Pimpinella anisum</i>	Aniseed	Seed, essential oil
<i>Pinus</i> sp.	Turpentine	Essential oil, (oleo) resin
<i>Salvia officinalis</i>	Sage	Infusion, essential oil
<i>Syzygium aromaticum</i>	Cloves	Buds, essential oil
<i>Zingiber officinale</i>	Ginger	Rhizome

6.1 Η χημική σύσταση και ο τρόπος δράσης των φυτοβιοτικών

Τα φυτοβιοτικά περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα προϊόντων φυτικής προέλευσης όπως βότανα (ανθοφόρα, μη ξυλώδη και μη ανθεκτικά φυτά), μπαχαρικά (βότανα με έντονη οσμή ή γεύση που συνήθως προστίθενται στην τροφή του ανθρώπου), αιθέρια έλαια (πητικές λιπόφιλες ενώσεις) και ελαιορητίνες (εκχυλίσματα που προέρχονται από μη υδατικούς διαλύτες). Τα προϊόντα αυτά μπορούν να προστεθούν στη διατροφή των ζώων και να βελτιώσουν την παραγωγικότητα τους μέσω της ενίσχυσης των ιδιοτήτων των ζωοτροφών και να βελτιώσουν την ποιότητα των παραγόμενων προϊόντων των ζώων αυτών (Windisch et al., 2008). Η περιεκτικότητα σε δραστικές ουσίες και η χημική σύσταση των φυτοβιοτικών στα τελικά προϊόντα μπορεί να ποικίλλει σημαντικά βάσει των φυτικών μερών που χρησιμοποιούνται (σπόροι, φύλλα κλπ.), τη γεωγραφική προέλευση και την περίοδο συγκομιδής. Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει ότι τα φυτοβιοτικά προάγουν την ανάπτυξη και διαθέτουν σημαντικές αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Gheisar & Kim, 2017).

Οι ολιγοσακχαρίτες και οι πολυσακχαρίτες όπως η ινουλίνη (φρουκτάνη), οι φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες και οι αραβινογαλακτάνες που εξάγονται από τα φυτά είναι πιθανά υποκατάστατα των αντιβιοτικών όσων αφορά την χρήση των τελευταίων σαν αυξητικών παραγόντων. Πολλά φυτικά εκχυλίσματα περιέχουν υδατάνθρακες και κυρίως ετερογλυκάνες. Οι πρεβιοτικοί ολιγοσακχαρίτες λαμβάνονται με μία από τις τρεις ακόλουθες διαδικασίες: άμεση εκχύλιση φυσικών ολιγοσακχαριτών από φυτά, ελεγχόμενη υδρόλυση φυσικών, φυτικών πολυσακχαριτών και ενζυματική σύνθεση ή με χρήση υδρολασών. Οι χαμηλού μοριακού βάρους φρουκτοολιγοσακχαρίτες παρουσιάζουν ποικίλα οφέλη για την υγεία διεγείροντας την ανάπτυξη ευνοϊκών βακτηρίων στο έντερο.

Μια *in vitro* μελέτη έδειξε ότι η ινουλίνη και οι φρουκτοολισακχαρίτες ζυμώνονται κατά προτίμηση από βακτήρια του γένους *Bifidobacterium* καθώς οι πληθυσμοί των *E. Coli* και *C. Perfringens* διατηρούνται σε σχετικά χαμηλά επίπεδα. Από την άλλη, αραβινογαλακτάνες βρίσκονται σε πολλά φυτά διότι είναι απαραίτητες για την ελαστικότητα των φυτικών κυττάρων. Τόσο οι αραβινογαλακτάνες όσο και οι φουκογαλακτοξυγλυκάνες αξίζει να αναφερθεί πως είναι οι δύο κύριες βιοδραστικές ενώσεις της *Echinacea purpurea*, ενός φυτού, το οποίο χρησιμοποιείται κατά κόρον για τη θεραπεία του ανθρώπινου κρυολογήματος . Οι αραβινογαλακτάνες του αγριόπευκου ζυμώνονται από την εντερική μικροχλωρίδα αυξάνοντας έτσι τον αριθμό των ευεργετικών αναερόβιων βακτηρίων όπως τα *Bifidobacteria* και οι γαλακτοβάκιλλοι, ενώ παράλληλα μειώνεται ο πληθυσμός του *Clostridium perfringens* στα κόπρανα των σκύλων. Ανάμεσα στην πληθώρα πηγών φυτικών υλικών που είναι διαθέσιμες για την εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων, τα φύκη (μακροφύκη) αντιπροσωπεύουν μία πλούσια αλλά παρόλα αυτά αναξιοποίητη πηγή.

Τα φύκια αποτελούν μια πλούσια πηγή φυσικών πολυσακχαριτών, πολλοί εκ των οποίων έχουν εμπορική χρήση ιδιαίτερα στις ιατρικές βιομηχανίες καθώς επίσης και τροφίμων και καλλυντικών. Οι θειούχοι πολυσακχαρίτες είναι άφθονοι στα καφέ και στα κόκκινα φύκια. Το ευρύ φάσμα των βιολογικών ιδιοτήτων που διαθέτουν οι θειούχοι πολυσακχαρίτες φυκιών οφείλεται στη δομική τους διαμόρφωση η οποία είναι παρόμοια με αυτή των ενδογενών θεικών γλυκοζαμινογλυκανών και άλλων θεικών γλυκάνων που βρίσκονται στις κυτταρικές μεμβράνες κυττάρων θηλαστικών). Είναι γεγονός λοιπόν πως η περιεκτικότητα των φυτοβιοτικών σε πολυσακχαρίτες είναι αυτή που τους προσδίδει

την αντιμικροβιακή τους ιδιότητα καθώς οι ίδιοι θεωρούνται ανοσοενεργά συστατικά. Ένα κοινό χαρακτηριστικό των φυτοβιοτικών είναι το γεγονός ότι αποτελούν ένα πολύ περίπλοκο μίγμα βιοδραστικών συστατικών. Η ενίσχυση της ανάπτυξης μέσω της χρήσης αυτών είναι πιθανόν το αποτέλεσμα συνεργιστικών επιδράσεων μεταξύ πολύπλοκων ενεργών μορίων που υπάρχουν στα φυτοβιοτικά (Gheisar & Kim, 2017).

6.2 Αντιμικροβιακή δράση των φυτοβιοτικών

Η αντιμικροβιακή δράση (είτε βακτηριοκτόνος είτε βακτηριοστατική) των φυτοβιοτικών έναντι τροφιμογενών οργανισμών όπως τα πρωτόζωα και οι μύκητες έχει διερευνηθεί από πολλούς ερευνητές. Οι περισσότερες από αυτές τις έρευνες έχουν δείξει ότι οι φαινολικές ουσίες όπως η θυμόλη, η καρβακρόλη, το φαινυλοπροπάνιο, το λιμονένιο, η γερανιόλη και η σιτρονελλάλη είναι οι πιο δραστικές ενώσεις που διαθέτουν αντιμικροβιακές ιδιότητες. Σε μια πρόσφατα δημοσιευμένη έρευνα διατυπώθηκε η άποψη ότι η αντιμικροβιακή δράση των φυτοβιοτικών ποικίλλει ανάλογα με την θέση των λειτουργικών τους υδροξυλοομάδων και αλκαλοομάδων. Για παράδειγμα, μελέτες έχουν δείξει ότι ορισμένα από τα κοινά τερπενοειδή (π.χ. καρβακρόλη και θυμόλη) έχουν παρόμοια αντιμικροβιακά αποτελέσματα αλλά η δράση τους ενάντια στα Gram θετικά και τα Gram αρνητικά βακτήρια διαφέρει και εξαρτάται από τη θέση μίας ή περισσότερων λειτουργικών ομάδων στα μόρια τους.

Η οικογένεια των φυτικών ειδών *Labiatae* φαίνεται να έχει λάβει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον συμπεριλαμβανομένων των ειδών του θυμαριού, της ρίγανης και του φασκόμηλου που αποτελούν τους δημοφιλέστερους αντιπροσώπους της. Η μείωση του αριθμού των παθογόνων π.χ. του *Escherichia coli* στο έντερο των ζώων-ξενιστών μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένο αριθμό ωφέλιμων βακτηρίων π.χ. *Lactobacillus* (Gheisar & Kim, 2017). Ακολουθεί ο Πίνακας 6.2, ο οποίος περιγράφει την επίδραση των βασικών φυτοβιοτικών που χρησιμοποιούνται στη διατροφή των ζώων αναφορικά με την ανοσολογική απόκριση αυτών.

Πίνακας 6.2. Η επίδραση βασικών φυτοβιοτικών στην ανοσολογική απόκριση παραγωγικών ζώων (McNamara & Lucy, 2017).

Phytonutrient	Species	Dose rate	Immune response ¹	Implication	Reference
Curcumin	Dairy cows	2 g/d per head ²	Increased T helper cells	Adaptive immunity	Oh et al. (2013)
Curcumin	Dairy cows	2 g/d per head ²	No effect on 8-isoprostane	Oxidative stress	Oh et al. (2013)
Garlic	Dairy cows	5 g/d per head	No effect on white blood cells	Immune cells	Yang et al. (2007)
Garlic	Dairy cows	5 g/d per head	No effect on haptoglobin or serum amyloid A	Acute phase responses	Yang et al. (2007)
Garlic	Dairy cows	2 g/d per head ²	Increased T helper cells	Adaptive immunity	Oh et al. (2013)
Garlic	Dairy cows	2 g/d per head ²	Increased 8-isoprostane	Oxidative stress	Oh et al. (2013)
Grape	Sheep	10% of DM ³	Increased plasma total antioxidants	Oxidative stress	Gladine et al. (2007)
Juniper berry	Dairy cows	2 g/d per head	No effect on white blood cells	Immune cells	Yang et al. (2007)
Juniper berry	Dairy cows	2 g/d per head	No effect on haptoglobin or serum amyloid A	Acute phase responses	Yang et al. (2007)
Juniper oil	Goats	0.4, 0.8, and 2 mL/kg of DM	Increased SOD and decreased GSH peroxidase	Oxidative stress	Yesilbag et al. (2016)
Capsaicin	Dairy cows	2 g/d per head ²	Increased CD4 ⁺ T cells	Adaptive immunity	Oh et al. (2013)
Capsaicin	Dairy cows	250, 500, and 1,000 mg/d per head	Increased neutrophils and eosinophils	Acute phase responses	Oh et al. (2015)
Capsaicin	Dairy cows	250, 500, and 1,000 mg/d per head	No effect on TBARS and 8-isoprostane	Oxidative stress	Oh et al. (2015)
Capsaicin	Dairy cows	100 and 200 mg/d per head	Decreased haptoglobin and cortisol	Acute phase responses	Oh et al. (2017a)
Capsaicin	Dairy cows	100 and 200 mg/d per head	Decreased TBARS	Oxidative stress	Oh et al. (2017a)
Chestnut tannin	Dairy cows	10 g/kg of DM	Increased SOD and GSH peroxidase	Oxidative stress	Liu et al. (2013b)
Chestnut tannin	Dairy cows	10 g/kg of DM	Decreased TBARS	Oxidative stress	Liu et al. (2013b)
Quebracho tannins	Sheep	95.7 g/kg of DM	Increased ferric-reducing antioxidant power	Oxidative stress	López-Andrés et al. (2013)
Tea catechins	Goats	0, 2, 3, and 4 g/kg of DM	Reduced oxidized GSH	Oxidative stress	Zhong et al. (2011)
Tea catechins	Goats	2% of DM	Reduced muscle TBARS	Oxidative stress	Ahmed et al. (2015)
Tea catechins	Goats	0.5, 1, and 2% of DM	Increased proliferation of spleen cells	Oxidative stress	Ahmed et al. (2015)
Mixture ⁴	Dairy cows	185 g/d per head	Reduced somatic cells	Adaptive immunity	Hashemzadeh-Cigari et al. (2014)

¹SOD = superoxide dismutase; GSH = glutathione; CD = cluster of differentiation; TBARS = thiobarbituric acid reactive substances.

²Abomasal infusion.

³Ruminal infusion.

⁴Contained rosemary, cinnamon bark, turmeric, and clove bud.

6.3 Τα αιθέρια έλαια

Τα αιθέρια έλαια αποτελούν ένα πολύ χαρακτηριστικό παράδειγμα φυτοβιοτικών, τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως σαν πρόσθετα στη διατροφή των παραγωγικών ζώων με αποδεδειγμένα ιδιαίτερα ευεργετικά αποτελέσματα. Και τα ίδια χαρακτηρίζονται από τις αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, μιας και ανήκουν στην κατηγορία των φυτοβιοτικών και η μελέτη της δράσης αυτών έχει οδηγήσει σε μια πληθώρα αξιοσημείωτων αποτελεσμάτων. Η αντιμικροβιακή τους δράση έχει αποδοθεί στα τερπενοειδή και στις φαινολικές ενώσεις που περιέχουν, καθώς επίσης τα χημικά συστατικά, τις λειτουργικές ομάδες που περιέχονται σε αυτά, τις αναλογίες αυτών και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους. Επιπλέον, μετά από έρευνες που πραγματοποιήθηκαν αποδείχτηκε ότι ο συνδυασμός θυμόλης και καρβακρόλης εμφάνισε μεγαλύτερη αντιβακτηριακή δράση από κάθε ένωση (από τις δύο) μόνη της και πως η ανασταλτική δράση του αιθέριου ελαίου της ρίγανης οφείλεται στην συνεργιστική αντιβακτηριακή δράση των δύο αυτών ενώσεων. Ακόμη, αντικείμενο πολλών μελετών ήταν η αντιβακτηριακή δράση των ακατέργαστων ελαίων και των αποσταγμένων κλασμάτων ανήθου (*Anethum graveolens L.*), σπόρων και φύλλων κόλιανδρου (*Coriandrum sativum L.*) και ευκαλύπτου (*Eucalyptus dives*) ενάντια σε ορισμένα Gram θετικά και αρνητικά βακτήρια που προκαλούν αλλοιώσεις των τροφίμων (π.χ. *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* κλπ). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μέγεθος και το φάσμα της αντιβακτηριακής δράσης αυτών των μεμονωμένων κλασμάτων συχνά υπερέβαινε αυτά των ακατέργαστων ελαίων. Ανάμειξη αποσταγμένων κλασμάτων κόλιανδρου και ευκαλύπτου είχαν ως αποτέλεσμα πρόσθετες συνεργιστικές και ανταγωνιστικές επιδράσεις ενάντια στο είδος των βακτηρίων που εξετάστηκαν (Benchaar et al., 2008).

6.4 Αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση των φυτοβιοτικών

Η αντιοξειδωτική δράση των φυτοβιοτικών είναι μια άλλη βιολογική ιδιότητα που παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον. Η ικανότητα τους να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην πρόληψη ορισμένων ασθενειών που προκαλούνται από αυτές, όπως ο καρκίνος και οι καρδιακές παθήσεις. Ορισμένες μελέτες, έχουν επιτυχώς χρησιμοποιήσει αιθέρια έλαια, ειδικά αυτά από την οικογένεια φυτών Labiatae ως φυσικά αντιοξειδωτικά στην ανθρώπινη διατροφή καθώς επίσης και

στη διατροφή των ζώων συντροφιάς ενώ η αντιοξειδωτική δράση των φυτών αυτών οφείλεται στο γεγονός ότι αυτά περιέχουν φαινολικές ενώσεις (π.χ. ροσμαρινικό οξύ). Από την άλλη υπάρχουν στοιχεία που υποδηλώνουν ότι η αντιοξειδωτική δράση των φυτοβιοτικών δεν οφείλεται μόνο στις φαινολικές τους ουσίες αλλά και στις μη φαινολικές ενώσεις αυτών. Επιπλέον, τα φυτοβιοτικά μπορούν να επηρεάσουν ευεργετικά ορισμένα αντιοξειδωτικά ένζυμα όπως η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και η δισμουτάση του υπεροξειδίου επηρεάζοντας κατά συνέπεια τον μεταβολισμό των λιπιδίων στα ζώα (Gheisar & Kim, 2017).

Η φλεγμονή είναι μια φυσιολογική προστατευτική απόκριση που προκαλείται από τον τραυματισμό κάποιου ιστού ή τη μόλυνση προκειμένου να καταπολεμηθούν εισβολείς στο σώμα (μικροοργανισμοί) και να απομακρυνθούν νεκρά ή κατεστραμμένα κύτταρα ξενιστές. Τα αιθέρια έλαια, τα οποία ανήκουν στα φυτοβιοτικά, μπορούν να δράσουν σαν αντιφλεγμονώδεις παράγοντες λόγω του ότι μία από τις αντιφλεγμονώδεις τους αποκρίσεις είναι η οξειδωτική έκρηξη σε διάφορα κύτταρα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το αιθέριο έλαιο χαμομηλιού, το οποίο χρησιμοποιείται για αιώνες για την αντιφλεγμονώδη δράση του με σκοπό την ανακούφιση συμπτωμάτων που σχετίζονται με το έκζεμα, τη δερματίτιδα και με άλλους έντονους ερεθισμούς. Έχει επίσης αναφερθεί ότι το ροσμαρινικό οξύ, το ολεανολικό οξύ και το ουρσολικό οξύ είναι οι κύριοι μη πτητικοί δευτερογενείς μεταβολίτες που βρίσκονται στο αιθέριο έλαιο του είδους *Origanum spp.*, γεγονός που του προσδίδει ισχυρές αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Άλλα αιθέρια έλαια (π.χ. ευκάλυπτος, δεντρολίβανο, λεβάντα κ.α.) έχουν χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με άλλα φυτά (π.χ. πεύκο, γαρύφαλλο, μύρο) ως αντιφλεγμονώδεις παράγοντες (Gheisar & Kim, 2017).

6.5 Επίδραση των φυτοβιοτικών στην πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών

Οι βιολογικά δραστικές ουσίες που υπάρχουν στα βότανα όπως τα φλαβονοειδή, οι φαινόλες, οι γλυκοσίδες, οι κουμαρίνες, οι σαπωνίνες, τα τερπένια, τα αλκαλοειδή και το ανθρακένιο ασκούν πολυδιάστατη επίδραση στον οργανισμό ενώ τα βότανα μπορούν να βελτιώσουν την γευστικότητα της τροφής (Kiczorowska et al., 2015). Επιπλέον, προσφέρουν τη δυνατότητα ρύθμισης των πεπτικών διαδικασιών, διεγείρουν την όρεξη και βελτιώνουν τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και την υγεία των ζώων.

Τα πρόσθετα φυτικών ζωοτροφών βελτιώνουν την χρήση και την απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών στα μηρυκαστικά διεγείροντας την έκκριση σιέλου. Για παράδειγμα το σκόρδο, το πιπέρι καγιέν, το τζίντζερ, ο γλυκάνισος και το κύμινο ενισχύουν τη σύνθεση των χολικών οξέων στο συκώτι και την απέκκριση τους στη χολή, η οποία είναι ευεργετική για την πέψη και την απορρόφηση των λιπιδίων. Τα περισσότερα βότανα διεγείρουν την λειτουργία των παγκρεατικών ενζύμων (λιπάσες, αμυλάσες και πρωτεάσες) και αυξάνουν την δραστηριότητα των πεπτικών ενζύμων του γαστρικού βλεννογόνου. Εκτός από την επίδραση στη σύνθεση της χολής και στη δραστηριότητα των ενζύμων, τα βότανα επιταχύνουν την πέψη στο γαστρεντερικό σωλήνα στα μηρυκαστικά (Frankič et al., 2009). Τα αιθέρια έλαια που εξάγονται από τα βότανα και τα οποία χρησιμοποιούνται σαν πρόσθετα ζωοτροφών βελτιώνουν τις διαδικασίες ζύμωσης και πέψης, που πραγματοποιούνται στη μεγάλη κοιλία μέσω της διέγερσης της παραγωγής πτητικών λιπαρών οξέων (Christaki et al., 2012). Τα αιθέρια έλαια μπορούν, επιπλέον, να αποτρέψουν την παραγωγή μεθανίου, να βελτιώσουν τον μεταβολισμό των πρωτεϊνών καθώς και την αποτελεσματικότητα της τροφής, όπως επίσης και να αυξήσουν την ποσότητα του συζευγμένου λινολενικού οξέος στο γάλα (Patra, 2011). Δεδομένου ότι τα φυτικά εκχυλίσματα μπορούν να δράσουν σε διαφορετικά επίπεδα στις οδούς αποικοδόμησης υδατανθράκων και πρωτεϊνών, η προσεκτική επιλογή και η δημιουργία κατάλληλων συνδυασμών τους μπορεί να αποτελέσει ένα χρήσιμο εργαλείο για την αποτελεσματική ρύθμιση της βακτηριακής ζύμωσης στη μεγάλη κοιλία των μηρυκαστικών (Calsamiglia et al., 2007).

6.6 Επίδραση των φυτοβιοτικών στην ανάπτυξη των μηρυκαστικών

Τα φυτοβιοτικά, όπως προαναφέρθηκε, διεγείρουν την όρεξη αυξάνοντας έτσι την πρόσληψη τροφής και συμβάλλοντας σε υψηλότερο ποσοστό μετατροπής της τροφής ανά κιλό αύξησης βάρους. Έρευνες που πραγματοποιήθηκαν από τους Kraszewski et al. (2008) επιβεβαίωσαν ότι η προσθήκη κατά 1,0% και 2,0% βοτάνων, όπως μέντας (*Mentha*), τσουκνίδας (*Urtica*), χαμομηλιού (*Marticaria chamomilla*), θυμαριού (*Thymus vulgaris*), φασκόμηλου (*Salvia officinallis*), μάραθου (*Foeniculum vulgare*), πανσέ (*Viola tricolor L.*) και τριγωνέλλας (*Trigonella*) στο μίγμα συμπυκνωμένων ζωοτροφών συμβάλλει στην αυξημένη πρόσληψη στερεάς τροφής, σε σημαντικά υψηλότερο τελικό σωματικό βάρος καθώς και σε υψηλότερες τιμές ημερήσιας αύξησης βάρους αλλά και

βελτιωμένους ρυθμούς μετατροπής της τροφής ανά κιλό βάρους. Το λεμονόχορτο (*Cymbopogon Citrullus*) και η μέντα (*Mentha piperita*) αποτελούν παραδείγματα βοτάνων που βελτιώνουν την υγεία και την παραγωγικότητα των ζώων και χρησιμοποιούμενα ως πρόσθετα ζωοτροφών στα βοοειδή αυξάνουν τις αποδόσεις τόσο αυτών της κρεοπαραγωγικής κατεύθυνσης όσο και των γαλακτοπαραγωγών αγελάδων βελτιώνουν τόσο την υγεία όσο και την παραγωγικότητα των αγελάδων γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης καθώς η προσθήκη αυτών στη διατροφή τους είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της πεπτικότητας της ξηράς ουσίας όπως επίσης και την ημερήσια αύξηση βάρους και την καλύτερη αποτελεσματικότητα της τροφής. Επιπροσθέτως, οι σπόροι κυμίνου (*Cuminum cyminum*) προστιθέμενοι στο σιτηρέσιο αγελάδων είχαν ως αποτέλεσμα την μείωση των επιπέδων χοληστερόλης (Ghafaria et al., 2015). Ακόμη, πολλά βότανα αυξάνουν τις αποδόσεις σε πρόβειο γάλα π.χ. η τσουκνίδα (*Urtica dioica L.*), το κύμινο (*Carum carvi L.*) κ.α., ενώ επίσης παρασκευάσματα αιθέριων ελαίων έχουν αποδειχτεί ότι αυξάνουν τις αποδόσεις σε γάλα σε υψιπαραγωγές προβατίνες της φυλής Χίου (Giannenas et al., 2011).

6.7 Επίδραση των φυτοβιοτικών στη γαλακτοπαραγωγή

Το πιο γνωστό φυτό που υποστηρίζει τη γαλουχία είναι το γαϊδουράγκαθο (*Silybum marianum L.*) που περιέχει σιλυμαρίνη, η χρήση της οποίας σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής αποδείχτηκε σε διάφορες μελέτες ότι συνέβαλλε στην αύξηση της ημερήσιας απόδοσης γάλακτος κατά 3-4 kg αλλά και στη μείωση του αριθμού σωματικών κυττάρων στο γάλα. Επιπλέον, η τριγωνέλλα (*Trigonella graecum foenum L.*) χαρακτηρίζεται για τη γαλακτοποιητική της δραστηριότητα καθώς σε έρευνα που πραγματοποίησαν οι Abo El-Nor et al. (2007) διαπίστωσαν την αύξηση της ημερήσιας απόδοσης σε γάλα στα θηλυκά βουβάλια με ταυτόχρονη αύξηση στα επίπεδα των πρωτεϊνών και λακτόζης μετά την προσθήκη σπόρων τριγωνέλλας στο σιτηρέσιο αυτών. Επιπλέον, η τριγωνέλλα δύναται να αυξήσει την περιεκτικότητα σε λίπος, να μειώσει την χοληστερόλη καθώς επίσης και να αλλάξει το προφίλ των λιπαρών οξέων προστιθέμενη σε κατάλληλες ποσότητες. Επίσης, λόγω της ικανότητάς της να αναστέλλει την ανάπτυξη του *Pseudomonas* και του *Escherichia coli*, η τριγωνέλλα μπορεί να αποτελέσει συστατικό για τη θεραπεία της μαστίτιδας. Το άγριο είδος *Asparagus racemosus* μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την ενίσχυση της γαλουχίας στις αγελάδες καθώς σύμφωνα

με τους Saini et al. (2018) η προσθήκη αυτού σε σιτηρέσιο αγελάδων είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της απόδοσης σε γάλα αλλά και την περιεκτικότητα αυτού σε λίπος και πρωτεΐνες (Chwil and Skoczylas, 2021).

6.8 Επίδραση των φυτοβιοτικών στην πρόληψη και αντιμετώπιση της μαστίτιδας

Τα φυτοβιοτικά με τις βακτηριοκτόνες και βακτηριοστατικές ιδιότητές τους, την αντιφλεγμονώδη και αντιμυκητιακή δράση τους, τις επιδράσεις διέγερσης της φαγοκυττάρωσης στους βακτηριοφάγους, την υποστήριξη του ανοσοποιητικού συστήματος μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόληψη και την θεραπεία της φλεγμονής του μαστού (μαστίτιδα) με πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα φυτοβιοτικού το οποίο έχει σημαντική δράση ενάντια στα παθογόνα που είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση της μαστίτιδας αποτελεί το είδος *Lepidium virginicum* L.. Ακόμη, θετική επίδραση ενάντια στα *Staphylococcus aureus*, *Shigella spp.* και *Salmonella spp.* είχαν εκχυλίσματα του είδους *Brickellia veronicaefolia* Kunth που περιείχαν φλαβονοειδή, ταννίνες και τερπενοειδή. Επιπλέον, το είδος *Artemisia absinthium* διαθέτει υψηλά επίπεδα πολυφαινόλων που χαρακτηρίζονται για την αντιβακτηριακή τους δράση ενάντια σε παθογόνα που είναι υπεύθυνα για την πρόκληση μαστίτιδας (Pasca et al., 2017). Επίσης οι Stagos et al. (2012) ανέφεραν ότι εκχυλίσματα από *Mentha pulegium* L., *Sideritis raeseri* Boiss. et Heldr. ssp. *raeseri* και ορισμένων ειδών *Salvia* άσκησαν ισχυρή ανασταλτική δράση ενάντια στο *S. aureus*. Με την σειρά τους οι Hu et al. (2001) απέδειξαν ότι εκχυλίσματα σαπωνίνης από ρίζες ginseng είχαν ευεργετική επίδραση στην υγεία των μαστών (Chwil and Skoczylas, 2021).

7. Πειραματικό μέρος

Το πείραμα έλαβε μέρος στις εγκαταστάσεις του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και για την πραγματοποίηση αυτού χρησιμοποιήθηκαν 36 γαλακτοπαραγωγές προβατίνες της φυλής Χίου. Η φυλή Χίου αποτελεί από τις πιο μεγαλόσωμες Ελληνικές φυλές η οποία χαρακτηρίζεται από πρωιμότητα, υψηλή γονιμότητα (με δείκτη πολυδυμίας 1,6-2,0) και υψηλή γαλακτοπαραγωγική ικανότητα. Τα ζώα βρίσκονταν είτε στη δεύτερη είτε στην τρίτη γαλακτική περίοδο και σχεδόν 100 ημέρες μετά τον τοκετό. Επιπλέον, είχαν χωριστεί σε 3 ομάδες η κάθε μία από τις οποίες αποτελούνταν από 12 πρόβατα. Η ομάδα 1 (CONTROL) αποτελούσε τον μάρτυρα και για τη διατροφή της χρησιμοποιήθηκε ένα συμβατικό μίγμα γαλακτοπαραγωγής χωρίς την προσθήκη του προς μελέτη φυτοβιοτικού (Μίγμα Φυτικών Βιοενεργών Συστατικών, ΜΦΒ), για την ομάδα 2 (GROUP A) χρησιμοποιήθηκε σιτηρέσιο εμπλουτισμένο με το μίγμα των φυτικών βιοενεργών συστατικών – nuPhoria (ΜΦΒ) “phytogenic AUA-RUM – 0,05% και για την ομάδα 3 (GROUP B) χρησιμοποιήθηκε το ίδιο μίγμα γαλακτοπαραγωγής εμπλουτισμένο με προστατευμένο ΜΦΒ “phytogenic AUA-RUM protected – 0,05%” (λυοφυλίωση – freeze drying με μαλτοδεξτρίνη 50/50). Σε ημερήσια βάση, η κάθε προβατίνα προσλάμβανε κατά μέσο όρο 1 kg χόρτου μηδικής και 1 kg από τα παραπάνω μίγματα ανάλογα την ομάδα αυτής. Η παροχή τροφής γινόταν δύο φορές την ημέρα (8:00 το πρωί και 15:00 το μεσημέρι) και σε κάθε γεύμα κάθε προβατίνα προσλάμβανε κατά μέσο όρο 500g χόρτο και 500g μίγματος γαλακτοπαραγωγής. Τα ζώα αρμέγονταν σε καθημερινή βάση αλλά μία φορά την εβδομάδα γινόταν καταγραφή της ποσότητας του παραγόμενου γάλακτος και λήψη δείγματος γάλακτος για το κάθε ζώο. Εν συνεχεία, ακολουθούσαν μια σειρά από αναλύσεις. Οι αναλύσεις αυτές αφορούσαν τόσο την εκτίμηση της σύστασης του γάλακτος (π.χ. περιεκτικότητα αυτού σε λίπος), καθώς επίσης και τον αριθμό και το είδος των σωματικών κυττάρων που βρέθηκαν στο γάλα και αποτέλεσαν ένδειξη της επίδρασης των σιτηρεσίων αυτών στην ανοσολογική κατάσταση των ζώων. Οι τελευταίες αναλύσεις, οι οποίες περιγράφονται στην παρούσα Μεταπτυχιακή μελέτη, πραγματοποιούνταν, σε αντίθεση με τις πρώτες, ανά δύο εβδομάδες. Προκειμένου να επιτευχθεί η εκτίμηση αυτή των σωματικών κυττάρων με τη βοήθεια του κυτταρομετρητή ροής του Εργαστηρίου Ζωοτεχνίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου (FC500) ακολουθήθηκε αρχικά μία διαδικασία βάσει πρωτοκόλλου, η οποία περιγράφεται στη συνέχεια.

7.1 Διατροφή

Το σιτηρέσιο που χρησιμοποιήθηκε περιείχε αραβόσιτο, μαλακό σιτάρι, κριθάρι, πίτυρα, σόγια, ηλιάλευρο, μαρμαρόσκονη, αλάτι και τον απαραίτητο ισορροπιστή βιταμινών και ιχνοστοιχείων. Το φυτοβιοτικό είχε ως βάση πολυφαινόλες από το θυμάρι, την ελιά, το γλυκάνισο και τα εσπεριδοειδή. Από τα συστατικά που περιέχονταν σε αυτό, το θυμάρι είναι γνωστό για την αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική του δράση (Kumar et al., 2014). Επιπλέον, ο γλυκάνισος χρησιμοποιείται για τις ευεργετικές του επιδράσεις στην πέψη της τροφής, όπως επίσης και για τις αντιπαρασιτικές, αντιβακτηριακές, αντιμυκητιασικές και αντιπυρετικές του ιδιότητες. Τέλος, τόσο τα εσπεριδοειδή όσο και τα προϊόντα ελιάς έχει αποδειχτεί ότι δεν συμβάλλουν μόνο στη διέγερση της όρεξης και της πέψης της τροφής αλλά και στη διατήρηση της ευζωίας και στη βελτίωση των παραγωγικών ιδιοτήτων των ζώων (Frankič et al., 2009).

7.2 Κυτταρομετρητής ροής

Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της σύστασης των σωματικών κυττάρων είναι ο κυτταρομετρητής ροής FC 500 (Flow Cytometer) της εταιρείας Beckman Coulter του Εργαστηρίου Γενικής και Ειδικής Ζωοτεχνίας. Ο κυτταρομετρητής ροής FC 500 παρέχει αυτοματοποιημένη κυτταρομετρική ανάλυση ροής συμπεριλαμβανομένης της ανάλυσης DNA και διαθέτει την ικανότητα να αναλύει 5 χρώματα χρησιμοποιώντας είτε ένα απλό είτε ένα διπλό λέιζερ (Cytomics FC 500 manual). Επιπλέον, για την εκτίμηση του αριθμού των σωματικών κυττάρων καθώς και των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του γάλακτος χρησιμοποιήθηκε το όργανο Lactoscan Combo του Εργαστηρίου Ανατομίας και Φυσιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου.

7.3 Πρωτόκολλο απομόνωσης σωματικών κυττάρων από πρόβειο νωπό γάλα

1. Αφού πραγματοποιήθηκε η άμελξη των ζώων, το γάλα συγκεντρώθηκε σε αποστειρωμένα φιαλίδια falcon, περιεκτικότητας 50 ml και παρέμειναν σε πάγο σε θερμοκρασία 4 βαθμών Κελσίου, χωρίς τη χρήση κάποιου συντηρητικού.

2. Στη συνέχεια από κάθε ένα από τα παραπάνω δείγματα γάλακτος (50 ml) καθενός από τα 36 πρόβατα που αρμέχθηκαν, τοποθετήθηκαν 15 ml σε νέα φιαλίδια falcon περιεκτικότητας 15 ml, αφού όμως πρώτα διηθήθηκαν με τη βοήθεια γάζας προκειμένου να απομακρυνθούν τα στερεά σωματίδια που μπορεί να βρίσκονταν σε αυτά.
3. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα 400xg για 15 λεπτά στους 4 βαθμούς Κελσίου. Ο αριθμός 400xg αντιπροσωπεύει τον αριθμό των στροφών που πραγματοποιούνται ανά λεπτό στο εσωτερικό της φυγοκέντρου.
4. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης απομακρύνθηκε η κρέμα και το υπερκείμενο και πραγματοποιήθηκε επαναιώρηση αυτού σε διάλυμα PBS (PBS: Phosphate Buffered Saline)+ 15 ml.
5. Στη συνέχεια, ακολούθησε μία δεύτερη φυγοκέντρηση στις 400xg για 10 λεπτά και πάλι στους 4 βαθμούς Κελσίου.
6. Αφού ολοκληρώθηκε και η δεύτερη φυγοκέντρηση πραγματοποιήθηκε και πάλι απομάκρυνση του υπερκειμένου με τη χρήση αντλίας κενού και επαναιώρηση αυτού σε 1 ml διαλύματος PBS++. Στη συνέχεια έγινε μεταφορά αυτού σε φιαλίδιο falcon το οποίο περιέχει ήδη 3 ml διαλύματος PBS+.
7. Στη συνέχεια ακολούθησε η τρίτη φυγοκέντρηση στα 400xg για 10 λεπτά και πάλι στους 4 βαθμούς.
8. Αφού ολοκληρώθηκε και η τρίτη φυγοκέντρηση, απομακρύνθηκε και πάλι το υπερκείμενο με τη χρήση αντλίας κενού και επαναιώρηση σε 1 ml διαλύματος PBS++ και ανάδευση των φιαλιδίων με την βοήθεια του Vortex.
9. Έπειτα πραγματοποιήθηκε φιλτράρισμα του περιεχομένου των φιαλιδίων με τη βοήθεια ηθμών (cell strainers) με οπές διαμέτρου 40μm και στη συνέχεια το περιεχόμενο αυτό μεταφέρθηκε σε νέο φιαλίδιο falcon.
10. Κάθε δείγμα ακολούθως χωρίστηκε σε δύο aliquots των 450μl και τα υπόλοιπα 100μl χρησιμοποιήθηκαν για mix cells SS (Single Stains) και προστέθηκαν 2-2,5 ml PBS++ σε κάθε φιαλίδιο.
11. Σε αυτό το σημείο πραγματοποιήθηκε μία ακόμη φυγοκέντρηση στις 400xg στροφές για 5 λεπτά στους 4 βαθμούς Κελσίου.
12. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε και πάλι απομάκρυνση του υπερκειμένου με τη χρήση αντλίας κενού και επαναιώρηση σε 50μl μίγματος αντισωμάτων (PBS & antibodies), όπως φαίνεται με χρώση X και Y (Πίνακες 7.1 και 7.2). Στην παρούσα Μεταπτυχιακή μελέτη χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα της κατηγορίας

FITC (Fluorescein IsoThioCynate, FITC) δηλαδή της φλουορεσκεΐνης στην ισοθειοκυανική της μορφή, η οποία αποτελεί τη πιο κοινώς χρησιμοποιούμενη χρωστική με περιοχή διεγέρσεως στα 488nm που συμπίπτει με το μήκος κύματος του LASER Αργού, που βρίσκεται στα περισσότερα όργανα κυτταρομετρίας. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα της κατηγορίας PE, δηλαδή η χρωστική φυκοερυθρίνη (Ταπάρκου, 2005).

13. Χρώση X

Πίνακας 7.1. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή της χρώσης X

Antibodies	Volume / Sample
CD11b FITC	1 μ l
CD8 PE	1 μ l
PBS++	48 μ l
Total	50 μ l

14. Χρώση Y

Πίνακας 7.2. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή της χρώσης Y.

Antibodies	Volume / Sample
CD4 FITC	1 μ l
CD8 PE	1 μ l
PBS++	48 μ l
Total	50 μ l

15. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε Vortex και επώαση των δειγμάτων για 30-40 λεπτά, στους 4 βαθμούς Κελσίου, στο σκοτάδι.
16. Μετά το πέρας του χρονικού αυτού διαστήματος προστέθηκαν 2ml PBS++ και έγινε φυγοκέντρηση των δειγμάτων στα 400xg για 5 λεπτά στους 4°C.
17. Αφού ολοκληρώθηκε και αυτή η φυγοκέντρηση ακολούθησε η απομάκρυνση του υπερκειμένου και για τις δύο χρώσεις (X και Y) και επαναιώρηση των δειγμάτων σε 10 μ l PI (5 μ g/ml). Για SS-Single Stains (mix cells) δεν προστέθηκε PI παρά μόνο το ίδιο.
18. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε η επώαση των δειγμάτων για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και η προσθήκη 150-200 μ l PBS++.
19. Τέλος, πραγματοποιήθηκε η ανάλυση των δειγμάτων στον Κυτταρομετρητή Ροής FC500.

7.4 Τρόπος λειτουργίας του Κυτταρομέτρου Ροής FC500

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω ο κυτταρομετρητής ροής αποτελείται από τρία συστήματα, το σύστημα ροής υγρών (ή υδροδυναμικό), το οπτικό και το ηλεκτρονικό σύστημα.

Το υδροδυναμικό σύστημα

Το σύστημα ροής υγρών είναι το σύστημα, μέσω του οποίου επιτυγχάνεται η μονήρης σωματιδιακή διάταξη του δείγματος, ώστε να επιτρέπεται η πρόσπτωση της φωτεινής δέσμης σε κάθε ένα μεμονωμένο σωματίδιο/κύτταρο που διέρχεται και με τον τρόπο αυτόν γίνεται η μέτρηση διάφορων παραμέτρων του (Ταπάρκου, 2005). Αναλυτικά, το σύστημα ρευστών αποτελείται από το υπό μελέτη δείγμα (sample) και από βασικό το υγρό περίβλημα (sheath fluid) το οποίο βρίσκεται σε ένα δοχείο (sheath tank) και συνήθως είναι φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα άλατος (PBS: Phosphate Buffered Saline) ή και νερό. Κατά την εφαρμογή διαφορετικής πίεσης στο δείγμα και στο υγρό περίβλημα επιτυγχάνεται διαφορετική ταχύτητα κίνησης των δύο υγρών, τα οποία καταλήγουν σε μια περιοχή που καλείται θάλαμος ροής (flow chamber) ή περιοχή υδροδυναμικής εστίασης (hydrodynamic focusing section), η οποία καταλήγει σε ένα πολύ μικρό στόμιο (ανοίγματα 50-300 μm). Σε αυτή την περιοχή τα κύτταρα συναντούν μια εστιαζόμενη πηγή φωτός προκαλώντας, ανάλογα με τα χαρακτηριστικά τους, σκέδαση φωτός και φθορίζοντα σήματα (Λιαδάκη, 2016).

Το οπτικό σύστημα

Καθώς τα κύτταρα διέρχονται σε μονήρη διάταξη από την κυψελίδα ροής, προσπίπτει σε αυτά κάθετα μία δέσμη φωτός. Οι πηγές Laser που χρησιμοποιούνται πλέον στα σύγχρονα κυτταρόμετρα εκπέμπουν ακτινοβολία μήκους κύματος 400-600nm, η οποία προκαλεί το φαινόμενο του σκεδασμού του φωτός, ενώ η σύνδεση συστατικών των κυττάρων με φθοριοσημασμένα μονοκλωνικά αντισώματα προκαλεί την εκπομπή φθορίζουσας ακτινοβολίας. Η ένταση της φθορίζουσας ακτινοβολίας εξαρτάται από το ποσό του αντισώματος που αντέδρασε με το υπό εξέταση αντιγόνο και τον αριθμό των κυττάρων του δείγματος που φέρουν το συγκεκριμένο μόριο ενώ με τη βοήθεια των φωτοανιχνευτών τα φωτεινά σήματα μετατρέπονται σε ηλεκτρικούς παλμούς ανάλογης έντασης. Για την εφαρμογή της μεθόδου της κυτταρομετρίας είναι απαραίτητη η χρήση φθορίζουσων χρωστικών ή φθοριοχρωμάτων (Μπουρνάκας, 2021).

Το ηλεκτρονικό σύστημα

Η λειτουργία του ηλεκτρονικού συστήματος του κυτταρομέτρου ροής είναι διπλή. Σε πρώτο σκέλος πραγματοποιείται μετατροπή φωτεινών σημάτων σε ηλεκτρονικά και σε δεύτερο σκέλος γίνεται εκτέλεση ανάλυσης δεδομένων (Μπουρνάκας, 2021). Τα σήματα που προέρχονται από τους φωτοανιχνευτές μετατρέπονται σε ψηφιακά δεδομένα προκειμένου να αναλυθούν και να αποθηκευτούν στον σκληρό δίσκο του ηλεκτρονικού υπολογιστή του κυτταρομετρητή. Δεδομένου ότι ανά δευτερόλεπτο αναλύονται χιλιάδες κύτταρα, ο όγκος των αποθηκεύσιμων δεδομένων που παράγονται κατά την κυτταρομετρική ανάλυση είναι τεράστιος. Τα δεδομένα αυτά αποθηκεύονται με την βοήθεια του λειτουργικού συστήματος FCS (Flow Cytometry Standard) σε όλα τα σύγχρονα κυτταρόμετρα, έτσι ώστε να είναι εφικτή η μετέπειτα ανάκτηση και μελέτη τους (Ταπάρκου, 2005).

Απεικόνιση των αποτελεσμάτων

Ο πιο συνήθης τρόπος παρουσίασης και ανάλυσης των σημάτων του κυτταρομετρητή είναι τα στικτογράμματα (dot plots) ή κυτταροδιαγράμματα και τα περιμετρικά διαγράμματα (contour plots) ή νεφελογράμματα. Τα γραφήματα αυτά βοηθούν στη μελέτη των κυτταρικών πληθυσμών ως προς δύο παραμέτρους, που αντιστοιχούν στους δύο άξονες του διαγράμματος (μέγεθος και κοκκιότητα) (Ταπάρκου, 2005).

8. Αποτελέσματα

Στη συνέχεια ακολουθούν Πίνακες και Διαγράμματα που παρουσιάζουν τους αριθμούς των σωματικών κυττάρων και των λεμφοκυττάρων, πολυμορφοπύρηνων και μακροφάγων, που είναι οι βασικές ομάδες κυττάρων που αποτελούν τα σωματικά κύτταρα, ο ρόλος των οποίων αναλύθηκε εκτενώς παραπάνω. Διευκρινίζεται ότι το Control είναι η ομάδα του μάρτυρα, το GROUP A είναι η δεύτερη ομάδα, όπου της χορηγήθηκε εμπλουτισμένο ΜΦΒ και το GROUP B είναι η τρίτη ομάδα, όπου της χορηγήθηκε το προστατευμένο ΜΦΒ στα επίπεδα των 0,05%. Οι τιμές εντός της ίδιας γραμμής με διαφορετικούς εκθέτες διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά ($P < 0,05$).

Πίνακας 8.1. Ο μέσος όρος των σωματικών κυττάρων των ζώων, των τριών ομάδων αυτών, που είχαν χωριστεί βάσει του σιτηρεσίου τους (CONTROL, GROUP A, GROUP B).

Εβδομάδα	CONTROL	GROUP A	GROUP B	Τυπικό Σφάλμα
0	1.172.212	1.151.965	1.059.051	378.218
1 ^η	538.103	659.176	416.098	151.805
2 ^η	793.333	537.667	186.987	249.191
3 ^η	391.083	361.917	218.532	132.765
4 ^η	401.917	388.500	228.623	126.727
5 ^η	456.833	357.083	474.714	321.514
6 ^η	309.167	253.083	227.532	55.387
7 ^η	399.417	321.917	218.532	130.784
8 ^η	433.583	266.583	127.896	134.568
9 ^η	271.083	221.917	120.532	45.103
10 ^η	227.833	204.833	199.260	35.479
11 ^η	227.833	179.833	171.987	31.997

Πίνακας 8.2. Ο λογαριθμικός αριθμός των σωματικών κυττάρων των ζώων, των τριών ομάδων αυτών, που είχαν χωριστεί βάσει του σιτηρεσίου τους (CONTROL, GROUP A, GROUP B).

Εβδομάδα	CONTROL	GROUP A	GROUP B	Τυπικό Σφάλμα
0	5,7	5,81	5,73	0,17
1 ^η	5,52	5,59	5,47	0,14
2 ^η	5,58a	5,59a	5,19b	0,11
3 ^η	5,25	5,41	5,25	0,12
4 ^η	5,41	5,45	5,23	0,1
5 ^η	5,52	5,4	5,46	0,14
6 ^η	5,41	5,23	5,29	0,1
7 ^η	5,3	5,38	5,25	0,11
8 ^η	5,34a	5,31a	4,95b	0,12
9 ^η	5,3a	5,23a	4,87b	0,12
10 ^η	5,26	5,24	5,21	0,09
11 ^η	5,26	5,2	5,18	0,08

Πίνακας 8.3. Ο μέσος όρος των λεμφοκυττάρων των ζώων, των τριών ομάδων αυτών, που είχαν χωριστεί βάσει του σιτηρεσίου τους (CONTROL, GROUP A, GROUP B), έτσι όπως καταγράφηκαν από τον κυτταρομετρητή.

Εβδομάδα	CONTROL	GROUP A	GROUP B	Τυπικό Σφάλμα
0	34,46	39,37	30	4,76
2 ^η	22,62	32,19	23,31	3,62
4 ^η	34,24	44,69	38,79	4,89
6 ^η	40,09	41,81	38,19	5,1
8 ^η	34,44	40,98	39,98	5,03
10 ^η	29,07	32,39	29,82	4,52
12 ^η	32,66	30,09	29,16	4,42

Πίνακας 8.4. Ο μέσος όρος των **μακροφάγων** των ζώων, των τριών ομάδων αυτών, που είχαν χωριστεί βάσει του σιτηρεσίου τους (*CONTROL, GROUP A, GROUP B*) έτσι όπως καταγράφηκαν από τον κυτταρομετρητή.

Εβδομάδα	CONTROL	GROUP A	GROUP B	Τυπικό Σφάλμα
0	2,51	2,06	1,6	0,35
2 ^η	5,09	2,79	2,28	0,78
4 ^η	2,61	2	1,44	0,49
6 ^η	3,74	2,14	2,04	0,87
8 ^η	4,61	2,6	3,46	0,92
10 ^η	5,65	3,39	2,82	1,49
12 ^η	5,69	4,21	3,74	1,37

Πίνακας 8.5. Ο μέσος όρος των **πολυμορφοπύρηνων** των ζώων, των τριών ομάδων αυτών, που είχαν χωριστεί βάσει του σιτηρεσίου τους (*CONTROL, GROUP A, GROUP B*), έτσι όπως καταγράφηκαν από τον κυτταρομετρητή.

Εβδομάδα	CONTROL	GROUP A	GROUP B	Τυπικό Σφάλμα
0	26,27	23,82	20,28	5,94
2 ^η	28,63	14,43	7,94	3,88
4 ^η	23,13	7,31	9,28	4,88
6 ^η	16,83	10,7	7,11	3,6
8 ^η	18,96	12,26	10,51	4,67
10 ^η	19,66	13,76	14,66	4,18
12 ^η	20,83	15,16	15,43	4,4

9. Σχολιασμός των αποτελεσμάτων

Όπως γίνεται αντιληπτό με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα τα επίπεδα των σωματικών κυττάρων παρουσίασαν μια τάση μείωσης κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Η μείωση αυτή έγινε αντιληπτή από την 2^η εβδομάδα του πειράματος και αν και δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, τα σωματικά κύτταρα έτειναν να μειώνονται με τα επίπεδα αυτών να φτάσουν σε πολύ χαμηλά επίπεδα στο τέλος του πειράματος σε σχέση με τις τιμές τους στην αρχή της πειραματικής διαδικασίας.

Τα σωματικά κύτταρα προέρχονται από το σώμα του ζώου και υπάρχουν σε χαμηλά επίπεδα στο φυσιολογικό γάλα. Η πλειοψηφία αυτών των κυττάρων στο γάλα είναι κύτταρα από τον εκκριτικό ιστό του μαστού (επιθηλιακά κύτταρα) και μερικά είναι λευκοκύτταρα (λευκά αιμοσφαίρια). Τα σωματικά κύτταρα αντιπροσωπεύουν τη δεύτερη γραμμή άμυνας του ζώου με πρώτους τους ανατομικούς και χημικούς φραγμούς της κορυφής της θηλής και του καναλιού της θηλής του μαστικού αδένα. Η παρουσία αυτών των κυττάρων στο γάλα είναι ένα φυσιολογικό φαινόμενο και είναι απαραίτητο για την αναγέννηση του επιθηλίου. Τα λευκά αιμοσφαίρια που εισέρχονται στο γάλα είναι όλα αιματογενή και χρησιμεύουν σαν μέρος του αμυντικού συστήματος. Η κύρια λειτουργία τους είναι να καταπολεμούν τις ασθένειες και να βοηθούν στην αποκατάσταση του κατεστραμμένου ιστού. Οποιαδήποτε ενδομαστική λοίμωξη (μαστίτιδα) οδηγεί σε αύξηση αυτών των κυττάρων στο γάλα και υποδηλώνει κακή υγιεινή του παραγόμενου γάλακτος. Ο αριθμός των σωματικών κυττάρων ποσοτικοποιείται ως ο αριθμός αυτών ανά ml γάλακτος. Η αύξηση του αριθμού των κυττάρων αυτών συνεπάγεται και αύξηση της σοβαρότητας της μόλυνσης (Alhussien and Dang, 2018).

Επιπροσθέτως, οι αριθμοί των λεμφοκυττάρων παρουσίασαν μία τάση αύξησης στα ζώα που αποτελούσαν την ομάδα GROUP 2 και στη συνέχεια ακολούθησαν με μικρές διαφορές οι ομάδες GROUP 1 και CONTROL (μάρτυρας). Οι ομάδα του μάρτυρα ξεπέρασε σε ορισμένες χρονικές περιόδους (εβδομάδα 0, 6 και 12) την ομάδα GROUP 1 στα επίπεδα των λεμφοκυττάρων, χωρίς όμως να σημειώσουν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Τα υψηλά επίπεδα των λεμφοκυττάρων, με την ομάδα GROUP 2 να υπερτερεί μερικώς, οφείλονται στην χορήγηση του παρόντος σιτηρεσίου και στις ιδιότητες αυτού εξαιτίας των συστατικών του. Όπως προαναφέρθηκε, τα φυτοβιοτικά χαρακτηρίζονται από μια πληθώρα ευεργετικών ιδιοτήτων για την υγεία του ζώου και συνεπώς του μαστού αυτού, ανάμεσα στις οποίες συγκαταλέγεται ο αντιμικροβιακός τους χαρακτήρας.

Αναφορικά, σύμφωνα με τον Tizard (2007), τα λεμφοκύτταρα είναι τα κύτταρα που αναγνωρίζουν και ανταποκρίνονται στα ξένα αντιγόνα. Συνεπώς, οι υψηλοί αριθμοί αυτών υποδηλώνουν πως η χορήγηση της συγκεκριμένης ζωοτροφής είχε ως αποτέλεσμα την βελτίωση της ανοσολογικής απόκρισης των ζώων. Πιο συγκεκριμένα, τα ζώα ανέπτυξαν μια ιδιαίτερα ισχυρή άμυνα έναντι σε ενδεχόμενη είσοδο παθογόνων μέσω του μαστού, γεγονός που συνέβαλλε καθοριστικά στο να γίνουν λιγότερο επιρρεπή σε παθήσεις του μαστού, όπως η μαστίτιδα.

Επιπλέον, τα επίπεδα τόσο των μακροφάγων όσο και των πολυμορφοπύρηνων ουδετερόφιλων βρίσκονταν σε χαμηλά επίπεδα στις δύο ομάδες ζώων που χρησιμοποιήθηκαν τα δύο σιτηρέσια που ήταν πλούσια σε φυτοβιοτικά (GROUP 1 και GROUP 2) σε σύγκριση με την ομάδα του μάρτυρα. Αξίζει να αναφερθεί πως ιδιαίτερα κατά την 2^η και την 10^η εβδομάδα ο αριθμός των μακροφάγων στο γάλα των ζώων, που αποτελούσαν την ομάδα του μάρτυρα, ήταν σχεδόν διπλάσιος από τον αριθμό των μακροφάγων στο γάλα των ζώων της ομάδας GROUP 2. Τα επίπεδα των μακροφάγων παρουσίασαν και τις υπόλοιπες εβδομάδες μια τάση αύξησης παρά το γεγονός ότι οι διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Επιπλέον, κατά την 2^η εβδομάδα ο αριθμός των ουδετερόφιλων της ομάδας GROUP 1 αποτελούσε σχεδόν το 50% του αριθμού των ουδετερόφιλων του μάρτυρα, ενώ ο αριθμός των ουδετερόφιλων της ομάδας GROUP 2 αποτελούσε σχεδόν το 1/3 του αριθμού των μακροφάγων του μάρτυρα. Ακόμη, κατά την 4^η εβδομάδα τα επίπεδα των ουδετερόφιλων της ομάδας GROUP 1 αποτελούσαν σχεδόν το 1/3 του ποσοστού των ουδετερόφιλων της ομάδας του μάρτυρα, ενώ τα ουδετερόφιλα της ομάδας GROUP 2 ήταν μειωμένα σχεδόν κατά το ήμισυ σε σχέση με τα επίπεδα του μάρτυρα. Επίσης, και την εβδομάδα 6 τα ουδετερόφιλα της ομάδας GROUP 2 αποτελούν λιγότερο από το 50% των ουδετερόφιλων της ομάδας του μάρτυρα, ενώ αξίζει να αναφερθεί ότι οι αριθμοί των ουδετερόφιλων παρουσίασαν ευρύτερα μια τάση μείωσης στις ομάδες των ζώων που είχαν χορηγηθεί τα σιτηρέσια στα οποία είχε προστεθεί το φυτοβιοτικό.

Σύμφωνα με τον Tizard (2007), τα ουδετερόφιλα αποτελούν τον κυτταρικό τύπο ο οποίος έλκεται στα σημεία της φλεγμονής. Ο ρόλος αυτών έγκειται στο γεγονός ότι συνδέονται και φαγοκυτταρώνουν τους εισβάλλοντες μικροοργανισμούς κι αυτό συμβαίνει καθώς οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες ενεργοποιούν τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων, έτσι ώστε τα ουδετερόφιλα που βρίσκονται στην κυκλοφορία του αίματος να προσκολλώνται σε αυτά πριν μεταναστεύσουν προς τις εστίες της μικροβιακής εισβολής και της

καταστροφής του ιστού. Από την άλλη, τα μακροφάγα μετακινούνται στις εστίες της φλεγμονής μετά τα ουδετερόφιλα και ο ρόλος τους περιλαμβάνει την πέψη και θανάτωση των μικροβιακών εισβολέων που επιβιώνουν των ουδετερόφιλων. Επιπλέον, τα μακροφάγα πέπτουν τα νεκρά ουδετερόφιλα περιορίζοντας έτσι την προκαλούμενη ιστική βλάβη από τα διαφεύγοντα ένζυμα των ουδετερόφιλων. Επίσης, τα μακροφάγα είναι υπεύθυνα για την απομάκρυνση των ξένων σωματιδίων από την κυκλοφορία του αίματος και τους αεραγωγούς. Αξίζει να αναφερθεί ότι τα ίδια είναι υπεύθυνα για την έναρξη της ίασης των κατεστραμμένων ιστών. Συνεπώς, οι μειωμένοι αριθμοί τόσο αυτών όσο και των πολυμορφοπύρηνων σε σχέση με τον μάρτυρα, αποτέλεσαν επίσης δείγμα της ιδιαίτερα καλής ανοσιακής κατάστασης του ζώου και πιο συγκεκριμένα της απουσίας οποιουδήποτε είδους και μορφής φλεγμονής καθ'όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

Αξίζει να αναφερθεί, πως σε μελέτη που πραγματοποίησαν οι Krivonogova et al (2021), στην οποία μελέτησαν την επίδραση ενός φυτοβιοτικού που αποτελούνταν από τα αιθέρια έλαια των φυτών *Salvia sclarea*, *Mentha canadensis*, *Mentha piperita* και *Coriandrum sativum*, παρατήρησαν ιδιαίτερα ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Η έρευνα πραγματοποιήθηκε σε αγελάδες, οι οποίες παρουσίαζαν κλινικές ενδείξεις φλεγμονωδών βλαβών του μαστού. Από τα σημεία αυτά, που αποτελούσαν τόσο το στόμιο της θηλής όσο και το δέρμα του μαστού, λήφθηκαν επιχρίσματα και πραγματοποιήθηκε μικροβιολογική ανάλυση. Στη συνέχεια, για μία εβδομάδα, τόσο στο δέρμα της θηλής όσο και στη βλεννογόνο μεμβράνη του στόμιου της θηλής γινόταν η εφαρμογή του σκευάσματος με ψεκάσμο στα μεσοδιαστήματα του αρμέγματος. Μετά το τέλος της θεραπείας λήφθηκαν ξανά επιχρίσματα από τα ίδια σημεία τα οποία οδηγήθηκαν για μικροβιολογική ανάλυση, όπου οι μικροοργανισμοί απομονώθηκαν και αναγνωρίστηκαν. Η μικροβιολογική ανάλυση του υλικού πριν από την εφαρμογή της θεραπείας έδειξε ότι οι βλεννογόνοι του στόμιου της θηλής ήταν σε μεγάλο βαθμό μολυσμένοι με παθογόνους όπως ο *S. Aureus*, ο *P.aeruginosa*, ο *C. albicans*, ο *S. uberis* και ο *E. Coli*, οι οποίοι εντοπίστηκαν σε ποσοστό μεγαλύτερο από 85% των δειγμάτων. Σε μικρότερα ποσοστά εντοπίστηκαν οι μικροοργανισμοί *P. vulgaris*, *Bacillus spp.*, *Enterobacter spp.* κ.α. Επιπλέον, εντοπίστηκαν ορισμένα είδη μυκήτων, όπως το *Aspergillus spp.* και *Penicillium spp.* Κατά την εφαρμογή του φυτοβιοτικού, το οποίο αποτελούνταν από τα προαναφερθέντα αιθέρια έλαια παρατηρήθηκε μεταβολή στη σύσταση των παθογόνων του μαστού αλλά και μείωση αυτών που είναι υπεύθυνοι για την πρόκληση φλεγμονωδών

διεργασιών στον βλεννογόνο της θηλής. Συνεπώς, δεδομένων των αποτελεσμάτων αυτών απεδείχθη ότι τα φυτοβιοτικά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σαν εργαλείο για την θεραπεία μολυσματικών διεργασιών στους μαστούς αγελάδων.

Επιπροσθέτως, σε μελέτη που πραγματοποίησαν οι Rajkumar and Gupta (2020) για τον έλεγχο της υποκλινικής μορφής της μαστίτιδας με την εφαρμογή μη αντιβιοτικής θεραπείας. Τα ζώα χωρίστηκαν σε 2 ομάδες η μία εκ των οποίων αποτελούσε τον μάρτυρα ενώ στην άλλη ομάδα ζώων εφαρμόζονταν ένα εμπορικό μη αντιβιοτικό σκεύασμα που αποσκοπούσε στον έλεγχο της ασθένειας μέσω της αύξησης της ικανότητας αντίστασης των ζώων έναντι παθογόνων που την προκαλούν. Τα ευρύματα και της συγκεκριμένης μελέτης απέδειξαν τις θεραπευτικές και προστατευτικές ιδιότητες του φυτικού σκευάσματος σε σχέση με την ενδεχόμενη χρήση αντιβιοτικού οι οποίες αποδίδονται στην παρουσία λιπόφιλων συστατικών του βοτάνου με αντιβακτηριδιακή και αντιφλεγμονώδη δράση. Το ανοσοθεραπευτικό δυναμικό της παρούσας μελέτης αποδεικνύεται και από την εξάλειψη της ενδομαστικής λοίμωξης, τη μείωση των σωματικών κυττάρων, την μείωση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας του γάλακτος και την ενισχυμένη φαγοκυτταρική δραστηριότητα του γάλακτος. Εναλλακτικές πρακτικές σαν αυτές που εφαρμόστηκαν στην συγκεκριμένη μελέτη, που βασίζονται στη χρήση βοτάνων, χαρακτηρίζονται εκτός από οικονομικότητα αλλά και ασφάλεια και αποτελεσματικότητα στη διαχείριση της υποκλινικής μαστίτιδας στα γαλακτοπαραγωγά ζώα. Επιπλέον, θα μπορούσαν να δοκιμαστούν σε περιπτώσεις κλινικής μαστίτιδας με σκοπό την μείωση των ημερών της θεραπευτικής αγωγής με αντιβιοτικά αλλά και των παρενεργειών της εφαρμογής του αντιβιοτικού στην υγεία του ζώου.

Ακόμη, αξίζει να αναφερθεί ότι οι Sharun et al. (2021) πραγματοποίησαν μελέτη στην οποία προσπάθησαν να αξιολογήσουν την επίδραση ορισμένων βοτάνων στον έλεγχο της μαστίτιδας των βοοειδών. Τα φυτά αυτά είχαν παρουσιάσει ιδιαίτερα σημαντικές αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδης ιδιότητες και ορισμένα είδη αυτών ήταν τα *Morinda citrifolia*, *Cinnamon cassia*, *Glycyrrhiza glabra*, *Tinospora cordifolia* κ.α. Στην παρούσα μελέτη τα παραπάνω είδη χορηγούνταν στο σιτηρέσιο των ζώων είτε αυτούσια (μέρη των φυτών όπως π.χ. τα φύλλα), είτε ο χυμός αυτών είτε το αιθέριο έλαιο που προέρχονταν από αυτά. Επίσης, η αποτελεσματικότητα των παραπάνω βοτάνων ελέγχθηκε όχι μόνο αναφορικά με τον έλεγχο της μαστίτιδας αλλά και με τη θεραπεία αυτής. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν μέσω της μελέτης αυτής ήταν ιδιαίτερα ενθαρρυντικά καθώς τα βότανα που χρησιμοποιήθηκαν φάνηκε να

διαδραματίζουν έναν πολύ σημαντικό ρόλο τόσο στον έλεγχο όσο και στη θεραπεία της μαστίτιδας. Η πραγματοποίηση περαιτέρω μελέτης προκειμένου να βρεθούν και οι κατάλληλες ποσότητες που θα πρέπει να χρησιμοποιούνται από τα παραπάνω βότανα, καθώς και η εύρεση των χημικών ενώσεων που είναι υπεύθυνες για τις ευεργετικές ιδιότητες των βοτάνων θα μπορούσε να βελτιώσει την δράση τους αλλά και να ενισχύσει την εμπιστοσύνη των καταναλωτών σε αυτά.

Επιπλέον, οι Hashemzadeh-Cigari et al. (2014) σε έρευνα που πραγματοποίησαν μελέτησαν την επίδραση που είχε η προσθήκη ενός μίγματος πλούσιου σε φυτοβιοτικά, στις επιδόσεις, στην υγεία του μαστού και στην μεταβολική κατάσταση των αγελάδων Holstein με ποικίλους αριθμούς σωματικών κυττάρων. Η έρευνα αυτή πραγματοποιήθηκε τόσο σε αγελάδες με φυσιολογικούς όσο και σε αγελάδες με υψηλούς αριθμούς σωματικών κυττάρων. Αναλυτικά, τα ζώα χωρίστηκαν σε δύο ομάδες ανάλογα με τους αριθμούς των σωματικών κυττάρων στο γάλα τους (φυσιολογικούς και υψηλούς) και στη συνέχεια η κάθε μία από τις δύο αυτές ομάδες χωρίστηκε σε δύο υποομάδες με βάση το σιτηρέσιο το οποίο τους χορηγούνταν, καθώς στη μία εκ των δύο υποομάδων της κάθε ομάδας χορηγούνταν το σιτηρέσιο το οποίο αποτελούνταν από το μίγμα φυτοβιοτικών ενώ στην άλλη υποομάδα όχι. Αναφορικά με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την μελέτη αυτή αποδείχτηκε ότι η προσθήκη του μίγματος φυτοβιοτικών είχε θετική επίδραση στα ζώα με υψηλούς αριθμούς σωματικών κυττάρων αν και στα ζώα με φυσιολογικούς αριθμούς σωματικών κυττάρων δεν είχε κάποια αξιοσημείωτη επίδραση. Επιπλέον, τα ζώα στα οποία χορηγούνταν το φυτοβιοτικό αύξησαν την κατανάλωση τροφής και παρήγαγαν μεγαλύτερες ποσότητες γάλακτος επιδεικνύοντας παράλληλα μια βελτιωμένη αξιοποίηση της τροφής. Συνεπώς, μέσω της μελέτης αυτής αποδείχτηκε ότι χορήγηση του μίγματος φυτοβιοτικών μείωσε τους αριθμούς των σωματικών κυττάρων στο γάλα ιδιαίτερα σε ζώα με υψηλούς αριθμούς, βελτιώνοντας παράλληλα την κατάσταση υγείας του μαστού καθώς επίσης και τις επιδόσεις των ζώων.

Στην παρούσα Μεταπτυχιακή μελέτη οι διαφορές που παρουσιάστηκαν κατά τη χορήγηση των προς εξέταση σιτηρεσίων δεν ήταν ιδιαίτερα έντονες, εντούτοις τόσο τα μακροφάγα όσο και τα πολυμορφοπύρρηνα παρουσίασαν μια τάση μείωσης στις ομάδες των ζώων που εφαρμόζονταν τα εν λόγω σιτηρέσια. Η παρούσα πειραματική διαδικασία ξεκίνησε στις 100 ημέρες της γαλακτικής περιόδου, γεγονός που πιθανότατα επηρέασε τα αποτελέσματα τα οποία θα ήταν πιο εμφανή σε περίπτωση που η πειραματική διαδικασία ξεκινούσε με την έναρξη της γαλακτικής περιόδου. Παρόλα αυτά τα αποτελέσματα ήταν

ικανοποιητικά και απέδειξαν ότι η εφαρμογή των υπό εξέταση σιτηρεσίων είχε θετική επίδραση στην ανοσιακή κατάσταση των ζώων. Συνεπώς, η εφαρμογή αυτών σε πραγματικές συνθήκες εκτροφής θα μπορούσε να αποδειχτεί ωφέλιμη για την υγεία των εκτρεφόμενων ζώων, γεγονός που θα μπορούσε να επιφέρει πληθώρα θετικών αποτελεσμάτων για την ποιοτική και οικονομική ευημερία της μονάδας.

10. Συμπεράσματα

Η παρούσα Μεταπτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε με σκοπό να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα της χρησιμοποίησης φυτικών βιοενεργών συστατικών στο σιτηρέσιο των γαλακτοπαραγωγών ζώων. Ο παράγοντας που διερευνήθηκε ήταν η βελτίωση ή μη της ανοσιακής κατάστασης των ζώων αναφορικά με παθήσεις του μαστού και πιο συγκεκριμένα της μαστίτιδας. Η μαστίτιδα, όπως έχει αναφερθεί, αποτελεί μία ιδιαίτερα δυσάρεστη παθολογική κατάσταση η οποία πλήττει τόσο την υγεία των ζώων αλλά αποτελεί και τροχοπέδη για την οικονομική ευμάρεια των εκτροφών. Οι συνέπειές της σε περίπτωση μη έγκαιρης θεραπείας της μπορεί να προκαλέσουν μόνιμες βλάβες στον μαστό του ζώου και κατά συνέπεια στην υγεία αυτού. Το μαστιτικό γάλα, επιπλέον, δεν καταναλώνεται και είναι ακατάλληλο για περαιτέρω επεξεργασία (τυροκόμηση και παρασκευή γιαουρτιού) και έτσι απορρίπτεται με συνέπεια οικονομικές απώλειες για την κτηνοτροφική μονάδα.

Τα φυτοβιοτικά αποτελούν φυτικές βιοενεργές ουσίες οι οποίες χαρακτηρίζονται για την πολυπαραγοντική ευεργετική τους δράση. Σύμφωνα με έρευνες, τα φυτοβιοτικά έχει αποδειχτεί ότι συμβάλλουν καθοριστικά στην ανάπτυξη των ζώων, στην βελτίωση της πεπτικότητας της τροφής τους καθώς επίσης και στην αύξηση της γαλακτοπαραγωγής. Επιπλέον, αξιοσημείωτη είναι η αντιμικροβιακή, η αντιφλεγμονώδης και αντιοξειδωτική τους δράση ενώ ιδιαίτερα ευεργετική φάνηκε να είναι η επίδραση αυτών στην πρόληψη της μαστίτιδας. Πιο συγκεκριμένα, τόσο σε μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στο παρελθόν όσο και στην παρούσα πτυχιακή μελέτη τα αποτελέσματα φάνηκαν να ήταν ιδιαίτερα ενθαρρυντικά. Η χορήγηση των εμπλουτισμένων με φυτοβιοτικά σιτηρεσίων φάνηκε να επιδρά ευεργετικά στην ανοσιακή κατάσταση των ζώων διατηρώντας σε σχετικά χαμηλά επίπεδα τις ομάδες κυττάρων που αποτελούν δείκτες για την ύπαρξη μικροβιακής λοίμωξης του μαστού. Αν και οι διαφορές που παρουσίαζαν τα ζώα που τους χορηγούνταν τα εν λόγω σιτηρέσια με εκείνα που τρέφονταν με συμβατικό σιτηρέσιο δεν ήταν ιδιαίτερα μεγάλες, τα επίπεδα των κυττάρων που μελετήθηκαν παρουσίαζαν μια σταθερή πτωτική πορεία. Το γεγονός αυτό συνέβαλλε στην επικύρωση της αρχικής υπόθεσης ότι η χορήγηση των φυτικών βιοενεργών συστατικών δεν θα μπορούσε παρά να ωφελήσει την υγεία των ζώων. Μολαταύτα, κρίνεται απαραίτητη η περαιτέρω μελέτη και αξιολόγηση της παρούσας υπόθεσης μεταβάλλοντας διάφορους συντελεστές της διαδικασίας που ακολουθήθηκε στην συγκεκριμένη Μεταπτυχιακή μελέτη. Παράγοντες

όπως η διάρκεια εφαρμογής των προς μελέτη σιτηρεσίων, καθώς και το χρονικό σημείο εφαρμογής τους (στάδιο γαλακτικής περιόδου) θα μπορούσαν να επηρεάσουν τα αποτελέσματα και να οδηγήσουν σε σαφέστερες και περισσότερο έντονες διαφορές, μειώνοντας επιπλέον τα επίπεδα των κυττάρων που αξιολογήθηκαν. Εντούτοις, η Μεταπτυχιακή αυτή μελέτη αποτέλεσε ένα ικανοποιητικό και διόλου ευκαταφρόνητο δείγμα της ωφέλιμης δράσης των φυτικών βιοενεργών συστατικών.

Βιβλιογραφία

- Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., & Nalbant, A. (2016) “Flow cytometry: Basic principles and applications,” *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(2), pp. 163–176. Available at: <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1128876>.
- Akers, R.M. & Nickerson, S.C. (2011) “Mastitis and its impact on structure and function in the ruminant mammary gland,” *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 16(4), pp. 275–289. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10911-011-9231-3>
- Alhussien, M.N. & Dang, A.K. (2018) “Milk somatic cells, factors influencing their release, future prospects, and practical utility in Dairy Animals: An overview,” *Veterinary World*, 11(5), pp. 562–577. Available at: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.562-577>
- Bąkowski, M. & Kiczorowska, B. (2021) “Probiotic microorganisms and herbs in ruminant nutrition as natural modulators of health and production efficiency – A Review,” *Annals of Animal Science*, 21(1), pp. 3–28. Available at: <https://doi.org/10.2478/aoas-2020-0081>
- Benchaar, C., Calsamiglia, S., Chaves, A. V., Fraser, G. R., Colombatto, D., McAllister, T. A., & Beauchemin, K. A. (2008). A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology*, 145(1-4), 209–228. <https://doi.org/10.1016/j.anifeeds.2007.04.014>
- Bergonier, D., Crémoux, R., Rupp, R., Lagriffoul, G., & Berthelot, X. (2003) “Mastitis of dairy small ruminants,” *Veterinary Research*, 34(5), pp. 689–716. Available at: <https://doi.org/10.1051/vetres:2003030>
- Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P. W., Castillejos, L., & Ferret, A. (2007). Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, 90(6), 2580–2595. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-644>
- Christaki, E., Bonos, E., Giannenas, I., & Florou-Paneri, P. (2012). Aromatic plants as a source of bioactive compounds. *Agriculture*, 2(3), 228–243. <https://doi.org/10.3390/agriculture2030228>
- Chwil, M. & Skoczylas, M.S. (2021) “Biologically active compounds of plant origin in medicine.” Available at: <https://doi.org/10.24326/mon.2020.10>
- Contreras, G.A. and Rodríguez, J.M. (2011) “Mastitis: Comparative etiology and Epidemiology,” *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 16(4), pp. 339–356. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10911-011-9234-0>
- Cytomics FC 500 Quick Reference (2005). Beckman Coulter Inc. Miami Education Center Miami Lakes.
- FAOSTAT, 2021. Data of Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Frankič, T., Voljč, M., Salobir, J., & Rezar, V. (2009). “Use of herbs and spices and their extracts in animal nutrition”. *Acta agriculturae Slovenica* 94(2):95-102.
- Gelasakis, A.I., Mavrogianni, V.S., Petridis, I.G., Vasileiou, N.G.C., & Fthenakis G.C. (2015) “Mastitis in sheep – the last 10 years and the future of Research,” *Veterinary*

Microbiology, 181(1-2), pp. 136–146. Available at:
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.07.009>

- Giannenas, I., Skoufos, J., Giannakopoulos, C., Wiemann, M., Gortzi, O., Lalas, S., & Kyriazakis, I. (2011). Effects of essential oils on milk production, milk composition, and rumen microbiota in Chios Dairy Ewes. *Journal of Dairy Science*, 94(11), 5569–5577. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-4096>
- Gordon, S. & Martinez, F.O. (2010) “Alternative activation of macrophages: Mechanism and functions,” *Immunity*, 32(5), pp. 593–604. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.05.007>
- Hadjigeorgiou, I., Vallerand, F., Tsimpoukas, K., & Zervas, G. (1998). “The socio-economics of sheep and goat farming in Greece, and the implications for future rural development,” Les systèmes ovins viande dans l'Union Européenne, une comparaison France-Royaume-Uni. In : Dubeuf J.-P. (ed.). L'Observatoire des Systèmes de Production Ovine et Caprine en Méditerranée : Chiffres clés et indicateurs de fonctionnement et d'évolution . Zaragoza : CIHEAM, 2002. p. 95-99 (Options Méditerranéennes : Série B. Etudes et Recherches; n. 39).
- Halasa, T., Huijps K., Østerås O., & Hogeveen, H. (2007) “Economic effects of bovine mastitis and Mastitis Management: A Review,” *Veterinary Quarterly*, 29(1), pp. 18–31. Available at: <https://doi.org/10.1080/01652176.2007.9695224>
- Hashemzadeh-Cigari, F., Khorvash, M., Ghorbani, G.R., Kadivar, M., Riasi, A., & Zebeli, Q. (2014) “Effects of supplementation with a phytobiotics-rich herbal mixture on performance, udder health, and metabolic status of Holstein cows with various levels of milk somatic cell counts,” *Journal of Dairy Science*, 97(12), pp. 7487–7497. Available at: <https://doi.org/10.3168/jds.2014-7989>
- Kehrl, M.E. & Shuster, D.E. (1994) “Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland,” *Journal of Dairy Science*, 77(2), pp. 619–627. Available at: [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(94\)76992-7](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(94)76992-7)
- Krivonogova, A., Isaeva, A., Chentsova, A., Musikhina N., & Petropavlovsky' M.(2021) “The influence of phytobiotic based on essential oils of salvia sclarea, mentha canadensis, mentha piperita and Coriandrum sativum on pathogenic microorganisms of lactating cow udder,” *E3S Web of Conferences*, 282, p. 04013. Available at: <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202128204013>
- Kumar, M., Kumar, V., Roy, D., Kushwaha, R., & Vaswani, S.(2014) “Application of herbal feed additives in animal nutrition - A Review,” *International Journal of Livestock Research*, 4(9), p. 1. Available at: <https://doi.org/10.5455/ijlr.20141205105218>
- Macey, M.G. (2007) “Principles of flow cytometry,” *Flow Cytometry*, pp. 1–15. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-59745-451-3_1
- Mavrogianni, V.S., P.I., Fragkou, I.A., & Fthenakis, G.C. (2011) “Principles of mastitis treatment in sheep and goats,” *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 27(1), pp. 115–120. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2010.10.010>

- McKinnon, K.M. (2018) “Flow cytometry: An overview,” *Current Protocols in Immunology*, 120(1). Available at: <https://doi.org/10.1002/cpim.40>
- McNamara, J. P., & Lucy, M. C. (2017). Journal of Dairy Science Volume 100 special issue: Introduction. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 9892–9893. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13889>
- Menzies, P.I. & Ramanoon, S.Z. (2001) “Mastitis of sheep and goats,” *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 17(2), pp. 333–358. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0749-0720\(15\)30032-3](https://doi.org/10.1016/s0749-0720(15)30032-3)
- Mohammadi Gheisar, M. & Kim, I.H. (2017) “Phytobiotics in poultry and swine nutrition – A Review,” *Italian Journal of Animal Science*, 17(1), pp. 92–99. Available at: <https://doi.org/10.1080/1828051x.2017.1350120>
- Nf-Uk (2020) *Udder morphology*, *EuroSheep Network*. Available at: <https://eurosheep.network/udder-morphology/>
- Nishimura, M., Yoshida, T., El-Khodery, S., Miyoshi, M., Furuoka, H., Yasuda, J., & Miyahara, K. (2011) “Ultrasound imaging of mammary glands in dairy heifers at different stages of growth,” *Journal of Veterinary Medical Science*, 73(1), pp. 19–24. Available at: <https://doi.org/10.1292/jvms.09-0503>
- Nonnecke, B.J. & Harp, J.A. (1989) “Function and regulation of lymphocyte-mediated immune responses: Relevance to bovine mastitis,” *Journal of Dairy Science*, 72(5), pp. 1313–1327. Available at: [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(89\)79239-0](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(89)79239-0)
- Nudda A., Battacone, G., Bencini, R., & Pulina, G. (2004). “Nutrition and Milk Quality,” Pulina & Bencini, *Dairy Sheep Nutrition*. Wallingford, Oxfordshire: CABI Publishing. P. 129-149.
- Paape, M.J., Wiggans, G.R., Bannerman, D.D., Thomas, D.L., Sanders, A.H., Contreras, A., Moroni, P., & Miller, R.H. (2007) “Monitoring goat and sheep milk somatic cell counts,” *Small Ruminant Research*, 68(1-2), pp. 114–125. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.09.014>
- Patra, A. K. (2011). Effects of essential oils on rumen fermentation, microbial ecology and ruminant production. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 6(5), 416–428. <https://doi.org/10.3923/ajava.2011.416.428>
- Pulina, G. & Bencini, R. (2004) *Dairy Sheep Nutrition*. Wallingford: Cabi Publishing.
- Rajkumar K P. & Gupta DK. (2020) “An in vivo assessment of a non-antibiotic therapy for specific subclinical mastitis in dairy cows,” *Journal of Entomology and Zoology Studies* 2020; 8(5): 721-725.
- Rosales, C. (2018) “Neutrophil: A cell with many roles in inflammation or several cell types?,” *Frontiers in Physiology*, 9. Available at: <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00113>

- Ross, R. (1994) “The role of T lymphocytes in inflammation,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(8), p. 2879. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.91.8.2879>
- Ruegg, P.L. (2003) “Investigation of mastitis problems on farms,” *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 19(1), pp. 47–73. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0749-0720\(02\)00078-6](https://doi.org/10.1016/s0749-0720(02)00078-6)
- Schultz, L.H. (1977) “Somatic cells in milk-physiological aspects and relationship to amount and composition of milk,” *Journal of Food Protection*, 40(2), pp. 125–131. Available at: <https://doi.org/10.4315/0362-028x-40.2.125>
- Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S.A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J.T., & Sahebkar, A. (2018) “Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease,” *Journal of Cellular Physiology*, 233(9), pp. 6425–6440. Available at: <https://doi.org/10.1002/jcp.26429>
- Sharun, K., Haritha, C.V., Singhal, T., Nair, S.S., Yattoo, M.I., Chakraborty, S., Jambagi, K., Tuli, H.S., & Dhama K. (2021) “Potential Herbs for Bovine Mastitis Research - A Mini Review,” *The Indian Veterinary journal*,” 98 (4) : 9-16.
- Skoufos, I., Bonos, E., Anastasiou, I., Tsinas, A., & Tzora, A., (2020) “Effects of phytobiotics in healthy or disease challenged animals,” *Feed Additives*, pp. 311–337. Available at: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814700-9.00018-2>
- Souza, F.N., Blagitz, M.G., Penna, C.F.A.M., Della Libera, A.M.M.P., Heinemann, M.B., & Cerqueira, M.M.O.P (2012) “Somatic cell count in small ruminants: Friend or foe?,” *Small Ruminant Research*, 107(2-3), pp. 65–75. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.04.005>
- Surat, P. (2022). What is the difference between a Phagocyte, Macrophage, Neutrophil and Eosinophil?
- Tizard, I. (2008). Sickness behavior, its mechanisms and significance. *Animal Health Research Reviews*, 9(1), 87–99. <https://doi.org/10.1017/s1466252308001448>
- Udder morphology (2018). Dairy, Factsheets, Improve flock management, Improve Health, Meat, Reduce lamb mortality. Eurosheep Network. NF-UK.
- Vidanarachchi J.K., Mikkelsen, L., Sims, I., Iji, P., & Choct, M., (2005). “Phytobiotics: Alternatives to antibiotic growth promoters in monogastric animal feed”. Conference: Recent Advances in Animal Nutrition in Australia. At: Armidale, New South Wales, Australia. Volume: 15.
- Viguier, C., Arora, S., Gilmartin, N., Welbeck, K., & O’Kennedy, R. (2009). Mastitis detection: Current trends and future perspectives. *Trends in Biotechnology*, 27(8), 486–493. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.05.004>
- Windisch, W., Schedle, K., Plitzner, C., & Kroismayr, A. (2008) “Use of phytogetic products as feed additives for swine and Poultry1,” *Journal of Animal Science*, 86(suppl_14). Available at: <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0459>

- Wright, H.L., Moots, R.J., Bucknall, R.C., & Edwards, S.W. (2010) “Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases,” *Rheumatology*, 49(9), pp. 1618–1631. Available at: <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keq045>
- Ζυγογιάννης Δ. (2014) “Προβατοτροφία,” Τρίτη Έκδοση, Θεσσαλονίκη: ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΠΑΙΔΕΙΑ.
- Λιαδάκη, Κ. (2016). “Οι σύγχρονες τεχνικές βιο-ανάλυσης στην υγεία, τη γεωργία, το περιβάλλον και τη διατροφή”. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- Μπουρνάκας, Χ. (2021). “Κυτταρομετρία ροής: Αρχές και εφαρμογές στη σύγχρονη ιατρική ακριβείας και τις κυτταρικές θεραπείες”. Μεταπτυχιακή μελέτη. Ελληνικό Ανοικτό Πανεπιστήμιο.
- Ρογδάκης Εμμ. (2002) “Εγχώριες Φυλές Προβάτων: Περιγραφή, Φυλογένεια, Γενετική Βελτίωση, Διαφύλαξη,” Αθήνα: Εκδόσεις ΑγροΤύπος
- Σιμιτζής, Π. (2021). “Έκτροφή μυρηκαστικών, Αιγοπροβατοτροφία, Εισαγωγή-Στατιστικά. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Ταπάρκου, Α. (2005). "Εφαρμογή της κυτταρομετρίας ροής για τον έλεγχο της λειτουργικότητας των λεμφοκυττάρων. Μελέτη σε υγιή παιδιά και παιδιά με αυτοάνοσα ρευματικά νοσήματα”. Διδακτορική διατριβή. Ιατρική Σχολή Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.