

**ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ**  
**ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**  
**ΤΟΜΕΑΣ ΚΛΙΝΙΚΩΝ**  
**ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΩΝ ΖΩΩΝ**  
**ΜΟΝΑΔΑ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ ΠΤΗΝΩΝ**

**ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ Σ. ΤΣΙΟΥΡΗΣ**  
**ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ**

**ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ**  
**ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΝΕΚΡΩΤΙΚΗΣ ΕΝΤΕΡΙΤΙΔΑΣ**  
**ΣΤΑ ΚΡΕΟΠΑΡΑΓΩΓΑ ΟΡΝΙΘΙΑ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ**

**2010**



**ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ**  
**ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**  
**ΤΟΜΕΑΣ ΚΛΙΝΙΚΩΝ**  
**ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΩΝ ΖΩΩΝ**  
**ΜΟΝΑΔΑ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ ΠΤΗΝΩΝ**

**ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ Σ. ΤΣΙΟΥΡΗΣ**  
ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ

**ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ ΣΤΗΝ**  
**ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΝΕΚΡΩΤΙΚΗΣ ΕΝΤΕΡΙΤΙΔΑΣ**  
**ΣΤΑ ΚΡΕΟΠΑΡΑΓΩΓΑ ΟΡΝΙΘΙΑ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ  
2010

Υποβλήθηκε στην Κτηνιατρική Σχολή του Α.Π.Θ.

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Ιωάννα Ι. Γεωργοπούλου	Επ. Καθηγήτρια	<i>Επιβλέπουσα</i>
Αγγελική Σ. Τσερβένη-Γούση	Καθηγήτρια	<i>Μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής</i>
Νικόλαος Γ. Παπαϊωάννου	Αν. Καθηγητής	<i>Μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής</i>

**ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Αγγελική Σ. Τσερβένη-Γούση	Καθηγήτρια
Χρήστος Α. Μπάτζιος	Καθηγητής
Τιμολέων Σ. Ράλλης	Καθηγητής
Νικόλαος Γ. Παπαϊωάννου	Αναπληρωτής Καθηγητής
Ιωάννα Ι. Γεωργοπούλου	Επίκουρη Καθηγήτρια
Πασχάλης Δ. Φορτομάρης	Επίκουρος Καθηγητής
Ευανθία Ι. Πετρίδου	Λέκτορας

© Βασίλειος Σ. Τσιούρης

© Α.Π.Θ.

**«ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΝΕΚΡΩΤΙΚΗΣ ΕΝΤΕΡΙΤΙΔΑΣ ΣΤΑ ΚΡΕΟΠΑΡΑΓΩΓΑ ΟΡΝΙΘΙΑ».**

ISBN:

*«Η έγκριση της Διδακτορικής διατριβής υπό της Κτηνιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, δεν υποδηλοί αποδοχήν των γνωμών του συγγραφέως».*

*(Νόμος 5343/32, άρθρ. 202 § 2 και ν. 1268/82, άρθρ. 50 § 8).*



## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

---

<b>ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΟΡΩΝ .....</b>	<b>9</b>
--	----------

---

<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....</b>	<b>11</b>
----------------------	-----------

---

<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....</b>	<b>17</b>
-----------------------	-----------

---

<b>ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ .....</b>	<b>21</b>
--	-----------

---

<b><u>1. ΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΣΩΛΗΝΑ.....</u></b>	<b><u>23</u></b>
---	------------------

1.1 Μικροχλωρίδα γαστρεντερικού σωλήνα.....	23
---	----

1.2 Επίδραση εντερικής μικροχλωρίδας στον ξενιστή.....	26
--	----

<b><u>2. ΝΕΚΡΩΤΙΚΗ ΕΝΤΕΡΙΤΙΔΑ.....</u></b>	<b><u>29</u></b>
--	------------------

2.1 Γενικά .....	29
------------------	----

2.2 Οικονομικές επιπτώσεις .....	29
----------------------------------	----

2.3 Αιτιολογία.....	30
---------------------	----

2.4 Παθογένεια.....	33
---------------------	----

2.5 Μετάδοση .....	35
--------------------	----

2.6 Επιδημιολογία.....	37
------------------------	----

2.7 Ανάδυση .....	38
-------------------	----

2.7.1 Αντιμικροβιακοί αυξητικοί παράγοντες.....	38
---	----

2.7.2 Μηχανισμός δράσης των ΑΑΠ.....	39
--------------------------------------	----

2.7.3 Κατάργηση των ΑΑΠ.....	40
------------------------------	----

2.7.4 Επιπτώσεις της κατάργησης των ΑΑΠ.....	42
--	----

2.7.5 Αντικλωστριδιακή δράση των ΑΑΠ και των αντικοκκιδιακών φαρμάκων .....	44
---	----

2.8 Προδιαθεσικοί παράγοντες.....	45
-----------------------------------	----

2.8.1 Τραυματισμός του γαστρεντερικού βλεννογόνου.....	45
--	----

2.8.2 Σιτηρέσια υψηλής περιεκτικότητας σε ΜΣΠ .....	46
---	----

2.8.3 Σιτηρέσια υψηλής περιεκτικότητας πρωτεϊνών ζωικής προέλευσης .....	49
--	----

2.8.4 Σιτηρέσια υψηλής περιεκτικότητας σε έλαια ζωικής προέλευσης.....	51
--	----

2.8.5 Σιτηρέσια υψηλής περιεκτικότητας σε ψευδάργυρο .....	51
--	----

2.8.6 Επιβλαβείς ουσίες του σιτηρεσίου.....	52
---	----

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

2.8.7 Ποιοτικά χαρακτηριστικά του σιτηρεσίου.....	53
2.8.8 Διαχειριστικοί, περιβαλλοντικοί και λοιμώδεις παράγοντες .....	54
2.9 Συμπτώματα και αλλοιώσεις.....	55
2.9.1 Κλινική.....	56
2.9.2 Υποκλινική.....	59
2.9.3 Χολαγγειοηπατίτιδα .....	59
2.10 Διάγνωση.....	60
2.11 Διαφορική διάγνωση.....	62
2.12 Θεραπεία.....	63
2.13 Σχέση με τη δημόσια υγεία .....	64
2.14 Πειραματικά μοντέλα αναπαραγωγής.....	65
<b>3. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ.....</b>	<b>67</b>
3.1 Γενικά .....	67
3.2 Μέθοδοι περιορισμού της διατροφής.....	67
3.2.1 Ποσοτικός περιορισμός της διατροφής .....	67
3.2.1.1 Φυσικός περιορισμός της διατροφής.....	67
3.2.1.2 Περιορισμός της διατροφής μέσω του προγράμματος φωτισμού.....	68
3.2.2 Ποιοτικός περιορισμός της διατροφής.....	68
3.2.2.1 Περιορισμός της διατροφής με την προσθήκη άπεπτων συστατικών στο σιτηρέσιο.....	68
3.2.2.2 Περιορισμός της διατροφής με σιτηρέσια χαμηλής περιεκτικότητας σε θρεπτικά συστατικά .....	69
3.2.2.3 Περιορισμός της διατροφής με τη μεταβολή των φυσικών χαρακτηριστικών του σιτηρεσίου .....	69
3.2.2.4 Περιορισμός της διατροφής με την προσθήκη χημικών ή φαρμακευτικών ουσιών .....	70
3.3 Επίδραση του περιορισμού της διατροφής στις αποδόσεις .....	70
3.4 Επίδραση του περιορισμού της διατροφής στην ευζωία .....	71
3.5 Επίδραση του περιορισμού της διατροφής στην υγεία .....	71
<b>4. ΦΟΡΤΙΣΗ ΔΑΠΕΔΟΥ.....</b>	<b>73</b>
4.1 Γενικά .....	73
4.2 Επίδραση της φόρτισης δαπέδου στις αποδόσεις .....	75
4.3 Επίδραση της φόρτισης δαπέδου στην ευζωία .....	77
4.4 Επίδραση της φόρτισης δαπέδου στη συμπεριφορά.....	79
4.5 Επίδραση της φόρτισης δαπέδου σε συνθήκες εκτροφής.....	80

---

<b>5. ΘΕΡΜΙΚΗ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ .....</b>	<b>83</b>
5.1 Γενικά .....	83
5.2 Θερμική καταπόνηση των πτηνών .....	85
5.3 Επίδραση της θερμικής καταπόνησης στις αποδόσεις .....	86
5.4 Επίδραση της θερμικής καταπόνησης στην ευζωία .....	88
5.5 Επίδραση της θερμικής καταπόνησης στο πεπτικό σύστημα.....	88
<b>6. ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ ΛΟΓΩ ΨΥΧΟΥΣ.....</b>	<b>89</b>
6.1 Γενικά .....	89
6.2 Καταπόνηση των πτηνών λόγω ψύχους .....	90
6.3 Επίδραση του ψύχους στην ευζωία.....	91
6.4 Επίδραση του ψύχους στην υγεία.....	92
6.5 Επίδραση του ψύχους στο ανοσοποιητικό σύστημα.....	92
<b>7. ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ ΜΕ ΑΝΤΙΚΟΚΚΙΔΙΑΚΟ ΕΜΒΟΛΙΟ .....</b>	<b>95</b>
7.1 Γενικά .....	95
7.2 Βιολογικός κύκλος <i>Eimeria</i> spp.....	96
7.3 Πρόληψη κοκκιδίωσης.....	97
7.3.1 Χημειοπροφύλαξη.....	97
7.3.2 Εμβολιασμός κατά της κοκκιδίωσης .....	99
7.3.2.1 Τα αντικοκκιδιακά εμβόλια.....	100
7.3.2.2. Μείωση της λοιμογόνου δύναμης των εμβολιακών ωοκύστεων.....	102
7.3.2.3 Η σύνθεση των ζωντανών αντικοκκιδιακών εμβολίων.....	103
7.4 Σχέση κοκκιδίωσης και εμβολιασμού με άλλα νοσήματα .....	104
<hr/> <b>ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ: Η ΔΙΚΗ ΜΑΣ ΕΡΕΥΝΑ.....</b>	<b>107</b>
<hr/>	
<b>1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>109</b>
1.1 Πτηνά και εγκαταστάσεις.....	109
1.2 Σιτηρέσια.....	111
1.3 Πειραματικός σχεδιασμός.....	113
1.3.1 Πειραματικός σχεδιασμός φυσικού περιορισμού διατροφής.....	113
1.3.2 Πειραματικός σχεδιασμός αυξημένης φόρτισης δαπέδου.....	114
1.3.3 Πειραματικός σχεδιασμός θερμικής καταπόνησης.....	115
1.3.4 Πειραματικός σχεδιασμός καταπόνησης λόγω ψύχους.....	116



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

---

1.3.5 Πειραματικός σχεδιασμός εμβολιασμού με ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο.....	117
1.4 Μόλυνση με <i>C. perfringens</i> .....	118
1.5 Μόλυνση με <i>Eimeria</i> spp.....	119
1.6 Μόλυνση με <i>Eimeria maxima</i> .....	119
1.7 Εμβολιασμός κατά της κοκκιδίωσης.....	120
1.8 Εμβολιασμός κατά της Λοιμώδους νόσου του Θυλάκου .....	120
1.9 Κλινική εξέταση, μέτρηση ΣΒ και υπολογισμός ΔΜΤ.....	120
1.10 Παρασιτολογική εξέταση .....	121
1.11 Μακροσκοπική εξέταση.....	121
1.12 Ιστοπαθολογική εξέταση.....	125
1.13 Μέτρηση pH εντερικού περιεχομένου .....	125
1.14 Μέτρηση ιξώδους εντερικού περιεχομένου.....	125
1.15 Βακτηριολογική εξέταση.....	125
1.16 Στατιστική ανάλυση .....	126
<b><u>2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</u></b>	<b><u>129</u></b>
2.1 Πειραματισμός φυσικού περιορισμού διατροφής .....	129
2.1.1 Σωματικό βάρος και δείκτης μετατρεψιμότητας της τροφής .....	129
2.1.2 Παρασιτολογική εξέταση.....	130
2.1.3 Μακροσκοπική εξέταση.....	130
2.1.4 Μέτρηση pH εντερικού περιεχομένου .....	134
2.1.5 Μέτρηση ιξώδους εντερικού περιεχομένου.....	135
2.1.6 Βακτηριολογική εξέταση.....	136
2.2 Πειραματισμός αυξημένης φόρτισης δαπέδου .....	138
2.2.1 Σωματικό βάρος και δείκτης μετατρεψιμότητας της τροφής .....	138
2.2.2 Παρασιτολογική εξέταση.....	139
2.2.3 Μακροσκοπική εξέταση.....	139
2.2.4 Μέτρηση pH εντερικού περιεχομένου .....	143
2.2.5 Μέτρηση ιξώδους εντερικού περιεχομένου.....	144
2.2.6 Βακτηριολογική εξέταση.....	145
2.3 Πειραματισμός θερμικής καταπόνησης.....	147
2.3.1 Σωματικό βάρος και δείκτης μετατρεψιμότητας της τροφής .....	147
2.3.2 Παρασιτολογική εξέταση.....	148
2.3.3 Μακροσκοπική εξέταση.....	148
2.3.4 Μέτρηση pH εντερικού περιεχομένου .....	152
2.3.5 Μέτρηση ιξώδους εντερικού περιεχομένου.....	153
2.3.6 Βακτηριολογική εξέταση.....	154

2.4 Πειραματισμός καταπόνησης λόγω ψύχους.....	156
2.4.1 Σωματικό βάρος και δείκτης μετατρεψιμότητας της τροφής .....	156
2.4.2 Παρασιτολογική εξέταση.....	157
2.4.3 Μακροσκοπική εξέταση.....	157
2.4.4 Μέτρηση pH εντερικού περιεχομένου .....	161
2.4.5 Μέτρηση ιζώδους εντερικού περιεχομένου .....	162
2.4.6 Βακτηριολογική εξέταση.....	163
2.5 Πειραματισμός εμβολιασμού με ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο.....	165
2.5.1 Σωματικό βάρος και δείκτης μετατρεψιμότητας της τροφής .....	165
2.5.2 Παρασιτολογική εξέταση.....	166
2.5.3 Μακροσκοπική εξέταση.....	167
2.5.4 Μέτρηση pH εντερικού περιεχομένου .....	171
2.5.5 Μέτρηση ιζώδους εντερικού περιεχομένου .....	172
2.5.6 Βακτηριολογική εξέταση.....	173
2.6. Ιστοπαθολογική εξέταση .....	176
<b><u>3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</u></b>	<b><u>179</u></b>
3.1 Πειραματισμός φυσικού περιορισμού της διατροφής .....	179
3.2 Πειραματισμός αυξημένης φόρτισης δαπέδου .....	184
3.3 Πειραματισμός θερμικής καταπόνησης.....	187
3.4 Πειραματισμός καταπόνησης λόγω ψύχους.....	191
3.5 Πειραματισμός εμβολιασμού με ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο.....	194
<b><u>4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</u></b>	<b><u>201</u></b>
<b><u>5. ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ.....</u></b>	<b><u>205</u></b>
<b><u>6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</u></b>	<b><u>209</u></b>
<b><u>SUMMARY.....</u></b>	<b><u>213</u></b>
<b><u>BIBLIOΓΡΑΦΙΑ .....</u></b>	<b><u>217</u></b>

---

---



**ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΟΡΩΝ**

<b>AcetylCoA</b>	Ακετυλοσυνένζυμο Α
<b>Cfu</b>	Μονάδα σχηματισμού αποικιών
<b>CK</b>	Κρεατινική κινάση
<b>CP</b>	<i>Clostridium perfringens</i>
<b>E</b>	<i>Eimeria</i> spp.
<b>ELISA</b>	Ενζυμική ανοσοπροσοφητική μέθοδος
<b>GALT</b>	Λεμφοειδής ιστός πεπτικού συστήματος
<b>IBD</b>	Λοιμώδης νόσος του Θυλάκου
<b>IL</b>	Ιντερλευκίνη
<b>LDH</b>	Γαλακτική αφυδρογονάση
<b>PBS</b>	Phosphate buffer saline
<b>PCR</b>	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
<b>PSE</b>	Αποχρωματισμένο, μαλακό, εξιδρωματικό
<b>PO</b>	Χορήγηση από το στόμα
<b>SRBC</b>	Ερυθρά αιμοσφαίρια προβάτου
<b>ΑΑΠ</b>	Αντιβιοτικός αυξητικός παράγοντας
<b>ΒΑΛΟ</b>	Βραχείας αλυσίδας λιπαρό οξύ
<b>ΔΜΤ</b>	Δείκτης μετατρεψιμότητας της τροφής
<b>ΕΕ</b>	Ευρωπαϊκή Ένωση
<b>ΕΛΔ</b>	Ελαττωμένη λοιμογόνος δύναμη
<b>Ε/Λ</b>	Ετερόφιλα κύτταρα προς λεμφοκύτταρα
<b>ΗΒ</b>	Ηνωμένο Βασίλειο
<b>ΗΠΑ</b>	Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής

## **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ**

---

<b>Μ.ο.</b>	Μέσος όρος
<b>ΜΣΠ</b>	Μη σακχαροειδείς πολυσακχαρίτες
<b>ΜΟΣ</b>	Μανάννη-ολιγοσακχαρίτης
<b>ΝΕ</b>	Νεκρωτική εντερίτιδα
<b>ΠΑΑ</b>	Προϊόν ανταγωνιστικού αποκλεισμού
<b>ΠΛΟ</b>	Πτητικό λιπαρό οξύ
<b>ΠΟΥ</b>	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
<b>ΣΒ</b>	Σωματικό βάρος
<b>ΣΒΣ</b>	Σωματικό βάρος κατά τη σφαγή
<b>ΦΟΣ</b>	Φρούκτο-ολιγοσακχαρίτης
<b>ΧΔΚ</b>	Χονδροδυστροφία της κνήμης

## **ΠΡΟΛΟΓΟΣ**

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στους εγκεκριμένους θαλάμους πειραματισμού και την κλινική της μονάδας «Παθολογίας Πτηνών» της Κλινικής των Παραγωγικών Ζώων της Κτηνιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ.

Το πρώτο μέρος της διδακτορικής διατριβής περιλαμβάνει ευρεία βιβλιογραφική ανασκόπηση του οικοσυστήματος της εντερικής μικροχλωρίδας και της NE στα κρεοπαραγωγά ορνίθια. Επίσης, γίνεται βιβλιογραφική ανασκόπηση της επίδρασης των διαχειριστικών πρακτικών και των παραγόντων καταπόνησης στην υγεία και τις αποδόσεις των κρεοπαραγωγών ορνιθίων. Στο δεύτερο μέρος περιγράφεται η δική μας έρευνα και συγκεκριμένα τα υλικά και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και τα αποτελέσματα που προέκυψαν. Στη συνέχεια, παρατίθεται η συζήτηση των αποτελεσμάτων, τα συμπεράσματα που προκύπτουν από την έρευνα και διατυπώνονται οι σχετικές προτάσεις. Η διατριβή ολοκληρώνεται με την περίληψη και τη σχετική βιβλιογραφία.

Θεωρώ πρωταρχικό μου καθήκον να εκφράσω εκ βάθους καρδιάς την ευγνωμοσύνη και τις θερμές μου ευχαριστίες στην επίκουρη Καθηγήτρια κα. Γεωργοπούλου Ιωάννα που με τίμησε με την ανάθεση της διδακτορικής διατριβής και με καθοδήγησε με θέρμη κατά τη διάρκεια αυτής της προσπάθειας. Την ευχαριστώ όχι μόνο για τις καίριες συμβουλές και τις επιστημονικές γνώσεις που μου μετέδωσε, αλλά και για το αμέριστο ενδιαφέρον και την ηθική συμπαράσταση που μου παρείχε καθόλη την διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής. Χωρίς την πολύτιμη βοήθεια και την αδιάλειπτη συνεισφορά της η διεκπεραίωση της παρούσας διατριβής θα ήταν αδύνατη.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα επίσης να εκφράσω στην Καθηγήτρια κα. Τσερβένη-Γούση Αγγελική, η οποία με τις πολύτιμες υποδείξεις και συμβουλές συνέβαλε στην ευδόκιμη ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής, στον Καθηγητή κ. Χαραλαμπίδη Στυλιανό, για τις πολύτιμες υποδείξεις του που συνέβαλαν στην ορθότερη συγγραφή της διδακτορικής διατριβής καθώς και στον αναπληρωτή Καθηγητή κ. Παπαϊωάννου Νικόλαο για τις εποικοδομητικές παρατηρήσεις και την καταλυτική του συμβολή στη διενέργεια των ιστοπαθολογικών εξετάσεων και στην εκτίμηση των αποτελεσμάτων τους.

Αισθάνομαι, επίσης, την ανάγκη να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Ράλλη Τιμολέων για την πολύπλευρη βοήθεια και την επιστημονική του καθοδήγηση, τον Καθηγητή κ. Μπάτζιο Χρήστο για την επιστημονική και ηθική στήριξη, καθώς και για την πολύτιμη βοήθεια τόσο στη σύνταξη του πρωτόκολλου της διδακτορικής διατριβής όσο στη στατιστική

αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της, τον επίκουρο Καθηγητή κ. Φορτομάρη Πασχάλη για την καθοριστική του συμβολή στην κατάρτιση του πειραματικού σχεδιασμού, στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων και τη συγγραφή της διδακτορικής διατριβής και την Λέκτορα κα. Πετρίδου Ευανθία για τις πολύτιμες υποδείξεις και συμβουλές που είχαν ως στόχο την καλύτερη απόδοση της ξενόγλωσσης επιστημονικής ορολογίας στην ελληνική γλώσσα και την ορθότερη συγγραφή της διδακτορικής διατριβής.

Τις θερμές μου ευχαριστίες θα ήθελα, επίσης, να απευθύνω στον Καθηγητή κ. Ducatelle Richard της Κτηνιατρικής Σχολής της Γάνδης του Βελγίου γιατί μου έδωσε τη χαρά να συνομιλήσω εποικοδομητικά μαζί του, να εκφράσω τους προβληματισμούς μου και να επωφεληθώ της έμπειρης επιστημονικής του καθοδήγησης. Θα ήθελα επίσης να τον ευχαριστήσω θερμά για την προσφορά του στελέχους 51 *Clostridium perfringens* με το οποίο διενεργήθηκαν οι μολύνσεις των πειραματόζων, καθώς και για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπαιδευτώ στο τμήμα της Παθολογικής Ανατομικής, Μικροβιολογίας και Παθολογίας Πτηνών της Κτηνιατρικής Σχολής της Γάνδης και να προετοιμαστώ για την εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες, θα ήθελα επίσης να εκφράσω στο διευθυντή της Κλινικής των Παραγωγικών Ζώων Καθηγητή κ. Μπόσκο Κωνσταντίνο για τη διάθεση του εξοπλισμού της κλινικής και την κάθε είδους διευκόλυνση που παρείχε για τη διεκπεραίωση της διδακτορικής διατριβής, στο διευθυντή της Κλινικής των Ζώων Συντροφιάς Καθηγητή κ. Ραπτόπουλο Δημήτριο για τη διάθεση των χειρουργικών εργαλείων και τη χρησιμοποίηση του κλιβάνου αποστείρωσης της μονάδας Χειρουργικής και Μαιευτικής των Ζώων Συντροφιάς, στον Καθηγητή κ. Κουτίνα Αλέξανδρο για τις πολύτιμες υποδείξεις του κατά τον πειραματικό σχεδιασμό, στον Dr. Marshall Ralph του Veterinary Laboratories Agency του Weybridge για την προσφορά των ωοκύστεων *Eimeria maxima* που χρησιμοποιήθηκαν για τη μόλυνση των πειραματόζων και στην επίκουρη Καθηγήτρια κα. Διάκου Αναστασία για τη συμβολή της στη διαλογή των ωοκύστεων και τον καθορισμό της μολύνουσας δόσης.

Αισθάνομαι επίσης την ανάγκη να ευχαριστήσω ένα μεγάλο «απόντα», τον επίκουρο Καθηγητή κ. Μπουγιουκλή Πέτρο για την επιστημονική καθοδήγηση και τις εποικοδομητικές παρατηρήσεις και υποδείξεις κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους της διδακτορικής διατριβής. Επίσης, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω και ως δάσκαλο μου για τη μετάδοση του επιστημονικού τρόπου σκέψης και κρίσης.

Θα αποτελούσε παράλειψη εκ μέρους μου αν δεν ευχαριστούσα τον κτηνίατρο κ. Στραβαρίδη Μιχάλη για τη παρασκευή των σιτηρεσιών που χρησιμοποιήθηκαν στη διδακτορική διατριβή, το διοικητή και το προσωπικό του Γ' Κτηνιατρικού Νοσοκομείου (Γ'

ΚΝΟ) Θεσσαλονίκης για τη διενέργεια δειγματοληπτικής μικροβιολογικής εξέτασης και χημικής ανάλυσης των σιτηρεσιών και του νερού, τα Εκκολαπτήρια-Πτηνοτροφεία Κουτσός-Τζώτζας ΑΕΒΕ για τη διάθεση των νεοσσών κρεοπαραγωγών ορνιθίων, τη φαρμακευτική εταιρεία Intervet/Schering Plough Animal Health για τη διάθεση του εξασθενημένου αντικοκκιδιακού εμβολίου, τον Ταγματάρχη (ΥΓ) κ. Σαρακατσάνο Ιωάννη για την καταλυτική του συμβολή στη διενέργεια ορισμένων εργαστηριακών εξετάσεων και τον κ. Πελέτη Γιώργο για το φιλικό ενδιαφέρον και την πολύτιμη βοήθειά του στην εγκατάσταση και τη λειτουργία του ηλεκτρολογικού και μηχανολογικού εξοπλισμού που χρησιμοποιήθηκε στο πειραματικό μέρος της διδακτορικής διατριβής.

Ευχαριστώ, επίσης, θερμά τον καθαριστή της μονάδας Παθολογίας Πτηνών κ. Μούλτο Σεραφείμ για την προσωπική ενασχόληση και την πολύτιμη βοήθεια που προσέφερε καθόλη τη διάρκεια του πειραματικού μέρους της διδακτορικής διατριβής, τον υποψήφιο διδάκτορα Δεληγεώργη Ιωάννη για την καταλυτική βοήθεια που παρείχε στη διενέργεια των εξετάσεων της διδακτορικής διατριβής, καθώς επίσης τον κτηνίατρο κ. Ζησίμου Γρηγόρη και τον κ. Γκουτζέλη Ιωάννη για το φιλικό τους ενδιαφέρον και την προσφορά τους στη διεκπεραίωση της διδακτορικής διατριβής. Τους ευχαριστώ ολόψυχα για το χρόνο που διέθεσαν και τον κόπο που κατέβαλαν κατά τη διάρκεια των πειραματισμών και για τη συνέπεια που επέδειξαν κατά τη συνεργασία μας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου και συγκεκριμένα στον πατέρα μου Σωτήρη, στη μητέρα μου Δήμητρα, στα αδέρφια μου Ιωάννη, Πολυξένη και Ράνια και τον θείο μου Χρήστο για την εμπιστοσύνη και τη γενικότερη στήριξη των προσπαθειών μου, καθώς και για την κατανόηση που έδειξαν όλα αυτά τα χρόνια. Ιδιαίτερα, ευγνωμονώ τον πατέρα μου, Σωτήρη, ο οποίος με τους καθημερινούς και αδιάλειπτους αγώνες που δίνει και την αισιοδοξία που τον διακρίνει αποτελεί για εμένα πηγή έμπνευσης και παράδειγμα προς μίμηση.

Ευχαριστώ, τέλος, την Επιτροπή Ερευνών του Α.Π.Θ., που με τίμησε και μου χορήγησε την «υποτροφία Αριστείας 2008» καθώς επίσης και όλους όσους κατά οποιοδήποτε τρόπο με βοήθησαν στην ολοκλήρωση της διδακτορικής διατριβής.





*Στους δικούς μου ανθρώπους...*

*Στη μνήμη του αείμνηστου συναδέλφου, συνεργάτη και δασκάλου  
επίκουρου Καθηγητή κ. Πέτρου Μπουγιουκλή.....*



## **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Τα θρεπτικά συστατικά, η μικροχλωρίδα και ο βλεννογόνος αλληλεπιδρούν κατά ένα πολύπλοκο και ενεργό τρόπο στο γαστρεντερικό σωλήνα των πτηνών, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη δυναμικής ισορροπίας μεταξύ τους (Niewold, 2007). Αυτό είναι αξιοθαύμαστο αν αναλογιστεί κανείς ότι ο γαστρεντερικός σωλήνας φιλοξενεί 640 διαφορετικά είδη βακτηρίων σε πληθυσμούς που ανέρχονται έως τις  $10^{11}$  μονάδες σχηματισμού αποικίας (cfu) ανά g εντερικού περιεχομένου (Arajalahti και συν., 2004).

Η νεκρωτική εντερίτιδα (NE) των κρεοπαραγωγών ορνιθίων αποτελεί κλασικό παράδειγμα νοσήματος-συνδρόμου που οφείλεται στη διαταραχή της δυναμικής ισορροπίας του οικοσυστήματος του γαστρεντερικού σωλήνα. Στην αιτιοπαθογένεια της NE, εκτός από το *Clostridium perfringens*, εμπλέκονται και άλλοι παράγοντες η επίδραση των οποίων δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί. Η εκδήλωση του νοσήματος προϋποθέτει την ταυτόχρονη δράση προδιαθεσικών παραγόντων, οι οποίοι διαμορφώνουν κατάλληλα τις συνθήκες στο γαστρεντερικό σωλήνα έτσι ώστε να ευνοείται ο πολλαπλασιασμός και η παραγωγή τοξινών από το *C. perfringens*. Οι παράγοντες που εμπλέκονται συχνότερα στην αιτιοπαθογένεια της NE στα κρεοπαραγωγά ορνίθια είναι: α) οι τραυματισμοί του γαστρεντερικού βλεννογόνου, β) η σύνθεση του σιτηρέσιου, γ) η ανοσοκαταστολή και δ) τα χειριστικά σφάλματα (Williams, 2005: McDevitt και συν., 2006).

Η NE ως νόσημα είναι γνωστό από το 1930, χωρίς ωστόσο να θεωρείται εκείνη την εποχή σημαντικό πρόβλημα για την πτηνοτροφία (Williams, 2005). Έξαρση στην εμφάνιση του νοσήματος παρατηρήθηκε μετά τη δεκαετία του 1990 και αποδόθηκε στην απαγόρευση της προληπτικής χρησιμοποίησης των αντιβιοτικών αυξητικών παραγόντων (ΑΑΠ) στα σιτηρέσια των κρεοπαραγωγών ορνιθίων (Kaldhusdal και Skjerve, 1996: Kocher, 2003: Williams, 2005). Επίσης, η διακοπή της χορήγησης κρεαταλεύρων, οστεαλεύρων και πτηναλεύρων στα σιτηρέσια των κρεοπαραγωγών ορνιθίων και η αντικατάστασή τους από τα ιχθυάλευρα, συνέβαλε επιπρόσθετα στην έξαρση του νοσήματος (Mateos και συν., 2002).

Η NE αποτελεί ένα νόσημα με σημαντικές οικονομικές επιπτώσεις, το οποίο εκτός από την επίδραση στην υγεία και την ευζωία των πτηνών συνιστά κίνδυνο και για τη δημόσια υγεία, με αποτέλεσμα κάθε παράγοντας που προδιαθέτει στην εκδήλωσή του να αποκτά ιδιαίτερη σημασία (Van der Sluis, 2000: Immerseel και συν., 2004).

Ο περιορισμός της διατροφής αποτελεί μία χειριστική πρακτική με αρκετές εφαρμογές στη συστηματική πτηνοτροφία (Lee και Leeson, 2001: Zhan και συν., 2007). Η

επίδραση του φυσικού περιορισμού της διατροφής στην παθογένεια της NE στα κρεοπαραγωγά ορνίθια παραμένει άγνωστη, παρόλο που η εφαρμογή του συνιστάται σε περιπτώσεις γαστρεντερίτιδας, όπως για παράδειγμα στα ζώα συντροφιάς (Ράλλης, 2006).

Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές σύμφωνα με τις οποίες η NE εκδηλώνεται συχνότερα κατά τους θερμούς μήνες του έτους (Long, 1973α: Hermans και Morgan, 2007), ενώ αντίθετα σύμφωνα με άλλη κατά τους ψυχρούς μήνες (Kaldhusdal και Skjerve, 1996). Το πλήθος των παραγόντων που εμπλέκονται στην εποχικότητα της συχνότητας εμφάνισης της NE, καθιστά δύσκολη αν όχι αδύνατη την απόδειξη της επίδρασης της θερμοκρασίας στην εκδήλωση της NE σε συνθήκες εκτροφής (McDevitt και συν., 2006).

Η φόρτιση δαπέδου επηρεάζει άμεσα την οικονομικότητα της εκτροφής κρεοπαραγωγών ορνιθίων (Purton και συν., 1995). Συγκεκριμένα, η αυξημένη φόρτιση δαπέδου προκαλεί μείωση των αποδόσεων, υποβάθμιση των συνθηκών ευζωίας και υγείας των πτηνών (Heckert και συν., 2002: Estevez, 2007) και προδιαθέτει στην εκδήλωση παθολογικών καταστάσεων, όπως η λοιμώδης ποδοδερματίτιδα και η κοκκιδίωση (Ekstrand και συν., 1997). Η επίδρασή της στην παθογένεια της NE παραμένει ακόμη άγνωστη.

Ο πιο σημαντικός προδιαθεσικός παράγοντας για την εκδήλωση της NE είναι η κοκκιδίωση, λόγω του τραυματισμού του γαστρεντερικού βλεννογόνου και της διάσπασης του εντερικού βλεννογόνιου φραγμού που προκαλεί (Al-Sheikly και Al-Saieg, 1980). Παρά το γεγονός ότι και τα ζωντανά αντικοκκιδιακά εμβόλια είναι δυνατόν να προκαλέσουν τραυματισμό και ήπιες μακροσκοπικές αλλοιώσεις στο γαστρεντερικό βλεννογόνο (Williams και Andrews, 2001), η επίδραση τους στην παθογένεια της NE δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί.

Ένα μεγάλο εμπόδιο για την κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στην παθογένεια της NE και την ανοσία που αναπτύσσουν τα πτηνά έναντι αυτής αποτελεί η μειωμένη αποτελεσματικότητα των πειραματικών μοντέλων που χρησιμοποιούνται για την αναπαραγωγή της. Επίσης, η ποικιλία διαφορετικών παραμέτρων που χρησιμοποιούνται σε κάθε πειραματικό μοντέλο κάνει αδύνατη τη συγκριτική μελέτη και ανάλυση των αποτελεσμάτων τους. Πειραματικά μοντέλα με ομοιομορφία σε όλες τις επιμέρους παραμέτρους θα επιτρέψουν περαιτέρω πρόοδο στην ανάπτυξη και την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας νέων μεθόδων για τον έλεγχο της NE στα ορνίθια.

Η απουσία αναφορών στη διεθνή βιβλιογραφία για την επίδραση των παραγόντων καταπόνησης στην παθογένεια της NE στα κρεοπαραγωγά ορνίθια και η υψηλή συχνότητα εφαρμογής των διαχειριστικών παραγόντων στη συστηματική πτηνοτροφία, αποτέλεσαν το κίνητρο για τη δική μας έρευνα και διαμόρφωσαν τους κυριότερους στόχους της.

Στόχος της διδακτορικής διατριβής ήταν η εκτίμηση της επίδρασης του φυσικού περιορισμού της διατροφής, της αυξημένης φόρτισης δαπέδου, της θερμικής καταπόνησης, της καταπόνησης λόγω ψύχους και του εμβολιασμού με ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο στην παθογένεια της ΝΕ και τις αποδόσεις στα κρεοπαραγωγά ορνίθια. Ένας επιπλέον στόχος ήταν η καθιέρωση ενός πιο αξιόπιστου πειραματικού μοντέλου αναπαραγωγής της ΝΕ, το οποίο να παρουσιάζει μεγαλύτερη σταθερότητα και επαναληψιμότητα.



## **ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ**

# **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ**



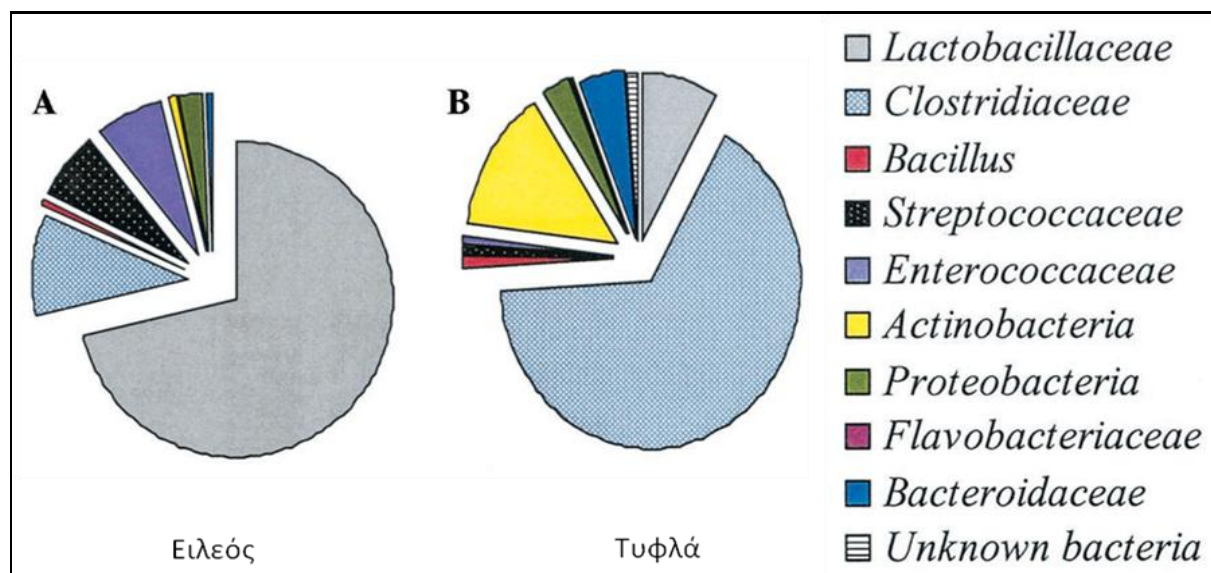


## 1. ΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΣΩΛΗΝΑ

### 1.1 Μικροχλωρίδα γαστρεντερικού σωλήνα

Ο γαστρεντερικός σωλήνας των ορνιθίων είναι στείρος κατά την εκκόλαψη και αποικίζεται σχεδόν αμέσως από τα βακτήρια του εκκολαπτηρίου και στη συνέχεια του πτηνοτροφείου. Είκοσι τέσσερις ώρες μετά την εκκόλαψη, ο πληθυσμός των βακτηρίων στον ειλέο και τα τυφλά ανέρχεται στις  $10^8$  και  $10^{10}$  cfu/g εντερικού περιεχομένου, αντίστοιχα (Arajahalti και συν., 2004). Φθάνει στο μέγιστο την τρίτη ημέρα μετά την εκκόλαψη, με πληθυσμό τις  $10^{11}$  cfu/g περιεχομένου τυφλών (Arajahalti και συν., 2004).

Υπάρχει μεγάλη ποικιλία στους βακτηριακούς πληθυσμούς που απαρτίζουν τη φυσιολογική μικροχλωρίδα στα επιμέρους τμήματα του γαστρεντερικού σωλήνα (Εικόνα 1.1.). Η ποιοτική και ποσοτική σύνθεση αυξάνεται προοδευτικά από τον αδενώδη στόμαχο προς τα τυφλά (Richards και συν., 2005). Ο πληθυσμός των προαιρετικά αναερόβιων βακτηρίων είναι μεγαλύτερος έως τις δύο πρώτες εβδομάδες της ζωής των πτηνών, ενώ στη συνέχεια κυριαρχούν τα υποχρεωτικά αναερόβια, ιδιαίτερα στον ειλέο και τα τυφλά (Rehman και συν., 2007; Kocher και Choct, 2008).



Εικόνα 1.1. Σύνθεση μικροχλωρίδας στον ειλέο και τα τυφλά των κρεοπαραγωγών ορνιθίων (Lu και συν., 2003).

Ο αριθμός των βακτηριακών κυττάρων του γαστρεντερικού σωλήνα είναι μεγαλύτερος από τον συνολικό αριθμό των ευκαρυωτικών κυττάρων του ξενιστή (Gabriel και συν., 2006). Οι βακτηριακοί πληθυσμοί, ανάλογα με τον πληθυσμό τους, μπορούν να ταξινομηθούν σε *κυρίαρχους*, όταν ο πληθυσμός τους ξεπερνά τις  $10^6$  cfu/g εντερικού περιεχομένου, σε *υποτελείς*, όταν ο πληθυσμός κυμαίνεται από τις  $10^6$  έως τις  $10^3$  cfu/g εντερικού περιεχομένου και σε *παραμένοντες*, όταν ο πληθυσμός τους δεν ξεπερνά τις  $10^3$  cfu/g εντερικού περιεχομένου (Gabriel και συν., 2006). Επίσης, ανάλογα με τη δράση τους, μπορούν να ταξινομηθούν σε επιβλαβείς και επωφελείς. Οι *επιβλαβείς* εμπλέκονται στην πρόκληση μόλυνσης και φλεγμονής, καθώς επίσης και στην παραγωγή τοξινών και καρκινογόνων ουσιών. Οι *επωφελείς* προάγουν την υγεία του ξενιστή και λαμβάνουν μέρος στην παραγωγή βιταμινών, την ανάπτυξη του ανοσοποιητικού συστήματος και την προστασία από παθογόνους μικροοργανισμούς (Jeurissen και συν., 2002). Ακόμη, οι βακτηριακοί πληθυσμοί, ανάλογα με την εντόπισή τους, μπορούν να ταξινομηθούν σε πληθυσμούς βακτηρίων του γαστρεντερικού αυλού και σε αυτούς του γαστρεντερικού βλεννογόνου. Οι βακτηριακοί πληθυσμοί του γαστρεντερικού βλεννογόνου υποδιαιρούνται σε πληθυσμούς βακτηρίων των επιθηλιακών κυττάρων και σε εκείνους των κρυπτών (Ewing και Cole, 1994: Jeurissen και συν., 2002).

Η ποιοτική και ποσοτική σύνθεση των βακτηριακών πληθυσμών του γαστρεντερικού αυλού επηρεάζεται από τη σύνθεση του σιτηρεσίου, το χρόνο διαβατότητας του γαστρεντερικού περιεχομένου και την ύπαρξη ουσιών με αντιμικροβιακή δράση. Η ποιοτική και ποσοτική σύνθεση των βακτηριακών πληθυσμών του βλεννογόνου εξαρτάται από την ικανότητα σύνδεσης των βακτηρίων με τους κυτταρικούς υποδοχείς, το ρυθμό σύνθεσης και έκκρισης βλέννης από τα καλυκοειδή κύτταρα, καθώς και από τα επίπεδα και την ειδικότητα της IgA (Jeurissen και συν., 2002). Τόσο τα βακτήρια του αυλού όσο και αυτά του βλεννογόνου επηρεάζονται άμεσα από παράγοντες καταπόνησης, όπως είναι η στέρηση τροφής, η μεταφορά, η εκδήλωση νοσήματος και η χορήγηση αντιβιοτικών (Ewing και Cole, 1994).

Η μικροχλωρίδα του γαστρεντερικού σωλήνα με τη μεταβολική της δραστηριότητα 1) *συμμετέχει στην ανάπτυξη του ανοσοποιητικού συστήματος* (Cebra και συν., 1999: Kelly και συν., 2004), 2) *επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων* (Bry και συν., 1996: Uribe και συν., 1997), 3) *συμβάλλει στην ακεραιότητα του εντερικού βλεννογόνιου φραγμού* (McPherson και συν., 2000: Hooper και

συν., 2001) και 4) *διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διάσπαση και απορρόφηση των συστατικών της τροφής* (Gibson και Roberfroid, 1995).

Ο γαστρεντερικός σωλήνας των πτηνών αποτελεί ένα σχετικά ανεξερεύνητο οικοσύστημα (Lu και συν., 2003). Οι περισσότερες πληροφορίες για την ποιοτική και ποσοτική σύνθεση και το μεταβολισμό της εντερικής μικροχλωρίδας των πτηνών προέρχονται από μελέτες της εικοσαετίας 1980-2000, στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν κυρίως εργαστηριακές τεχνικές καλλιέργειας και ανάπτυξης των βακτηρίων (Barnes και συν., 1972).

Ο πληθυσμός των βακτηρίων του γαστρεντερικού σωλήνα που προκύπτει μετά την καταμέτρηση με μικροσκοπική εξέταση είναι μεγαλύτερος κατά δύο δεκαδικούς λογάριθμους, συγκριτικά με αυτόν που προκύπτει με την καταμέτρηση με μεθόδους καλλιέργειας (Simon και συν., 2004). Η διαφορά αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι τα περισσότερα είδη βακτηρίων του γαστρεντερικού σωλήνα παρέμεναν άγνωστα, με αποτέλεσμα να μην είναι γνωστές οι συνθήκες που είναι απαραίτητες για την καλλιέργειά τους (Arajalahti και συν., 2004). Επίσης, ορισμένα βακτήρια έχουν αναπτύξει σχέσεις συμβίωσης με άλλα βακτήρια ή τον ξενιστή, δημιουργώντας ένα μοναδικό οικοσύστημα, το οποίο είναι σχεδόν αδύνατο να αναπαραχθεί σε συνθήκες εργαστηρίου (Simon και συν., 2004). Περιορισμοί των μεθόδων καλλιέργειας αποτελούν, επίσης, η εκλεκτικότητα των υποστρωμάτων που χρησιμοποιούνται, η καταπόνηση των βακτηρίων από τη διαδικασία της καλλιέργειας και οι αυστηρά αναερόβιες συνθήκες που απαιτούνται για την καλλιέργειά τους (Simon και συν., 2004).

Η ανακάλυψη καινοτόμων μοριακών και γενετικών τεχνικών οδήγησε στην αποκάλυψη των βασικών υποδομών του οικοσυστήματος της εντερικής μικροχλωρίδας και στην καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών αλληλεπίδρασής τους (Gong και συν., 2002: Lu και συν., 2003: Arajalahti και συν., 2004). Μεταξύ των επιδημιολογικών μελετών που έχουν διεξαχθεί για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό της εντερικής μικροχλωρίδας υπάρχουν διαφορές, οι οποίες αφορούν κυρίως την αναλογία των βακτηριακών πληθυσμών και σε μικρότερο βαθμό τα είδη των βακτηρίων που απομονώνονται. Οι διαφορές αυτές οφείλονται στη μοριακή τεχνική που χρησιμοποιείται, στο σιτηρέσιο, στις συνθήκες εκτροφής και στο γενότυπο των πτηνών (Rehman και συν., 2007).

Η εντερική μικροχλωρίδα των ορνιθίων αποτελείται από 640 διαφορετικά είδη που κατατάσσονται σε 140 γένη βακτηρίων (Arajalahti και συν., 2004). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των Zhu και συν. (2002), αναγνωρίστηκαν 243 διαφορετικές αλληλουχίες, αντιπροσωπεύοντας 50 φυλογενετικές ομάδες ή υποομάδες βακτηρίων, με το 89% να ανήκει σε 4 μόνο φυλογενετικές ομάδες. Από τα βακτήρια που αναγνωρίστηκαν, μόνο το 10% ήταν

ήδη γνωστά, ενώ το υπόλοιπο 90% παρέμεναν άγνωστα. Συγκεκριμένα, το 35% των άγνωστων βακτηρίων ανήκει σε βακτήρια γνωστού γένους, αλλά άγνωστου είδους, ενώ το υπόλοιπο 55% ανήκει σε βακτήρια με εντελώς άγνωστο γένος (Arajalahti και συν., 2004).

### **1.2 Επίδραση εντερικής μικροχλωρίδας στον ξενιστή**

Η αλληλεπίδραση των βακτηρίων της εντερικής μικροχλωρίδας με το γαστρεντερικό βλεννογόνο και η παραγωγή διάφορων μεταβολιτών, όπως τα βραχείας αλυσίδας λιπαρά οξέα (ΒΑΛΟ) και οι πολυαμίνες, έχουν ως αποτέλεσμα την πρόκληση ανατομικών και λειτουργικών μεταβολών στο γαστρεντερικό σωλήνα. Συγκεκριμένα, το βάρος του κενού γαστρεντερικού σωλήνα των εμπορικά εκτρεφόμενων ζώων είναι μεγαλύτερο, συγκριτικά με αυτό των ζώων χωρίς μικροχλωρίδα (αξενικά). Αυτό οφείλεται στην αύξηση του μήκους του γαστρεντερικού σωλήνα και στην πάχυνση των τοιχωμάτων του, εξαιτίας της αύξησης του λεμφοειδούς ιστού του χορίου. Επίσης, στα εμπορικά εκτρεφόμενα ζώα, οι λάχνες της νήστιδας και του ειλεού είναι υψηλότερες, αλλά η επιφάνεια που σχηματίζεται από τις μικρολάχνες μικρότερη. Ακόμη, το βάθος των κρυπτών, καθώς και ο αριθμός των υπό διαίρεση κυττάρων, είναι μεγαλύτερος, με συνέπεια τα κύτταρα να φθάνουν ταχύτερα στην κορυφή των λαχνών και να είναι λιγότερο ώριμα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, η συνολική δραστηριότητα των ενζύμων της ψηκτροειδούς παρυφής (ανά g ιστού), όπως της μαλτάσης και της σακχαράσης, τελικά να μειώνεται (Gabriel και συν., 2006).

Ένα από τα σημαντικότερα οφέλη της εντερικής μικροχλωρίδας για τον ξενιστή είναι η ενίσχυση της ανθεκτικότητάς του έναντι παθογόνων μικροοργανισμών. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται «ανταγωνιστικός ή βακτηριακός αποκλεισμός» ή «φαινόμενο Nurmi» (Nurmi και Rantala, 1973). Αυτό αποδεικνύεται από το γεγονός ότι τα αξενικά ζώα είναι πολύ πιο ευαίσθητα στις εντερικές μολύνσεις, συγκριτικά με τα εμπορικά εκτρεφόμενα ζώα (Dibner και Richards, 2005). Συγκεκριμένα, αρκούν μόνο 10 βακτήρια *Salmonella enteritidis* για να προκαλέσουν το θάνατο σε αξενικά ινδικά χοιρίδια, ενώ στα εμπορικά ινδικά χοιρίδια απαιτούνται  $10^9$  cfu (Freter, 1954: 1955). Ο μηχανισμός δράσης περιλαμβάνει τον ανταγωνισμό των βακτηρίων της εντερικής μικροχλωρίδας με τα παθογόνα βακτήρια τόσο για τα θρεπτικά συστατικά όσο και για τη σύνδεση με τους κυτταρικούς υποδοχείς (Gabriel και συν., 2006). Επίσης, τα βακτήρια της εντερικής μικροχλωρίδας εκκρίνουν ουσίες με αντιμικροβιακή δράση, όπως τις βακτηριοσίνες, τα ΒΑΛΟ, το γαλακτικό οξύ και το υπεροξειδίο του οξυγόνου (Gabriel και συν., 2006).

Η ανάπτυξη του ανοσοποιητικού συστήματος του γαστρεντερικού σωλήνα γίνεται παράλληλα με την εγκατάσταση και την ανάπτυξη της εντερικής μικροχλωρίδας.

Συγκεκριμένα, η εντερική μικροχλωρίδα επηρεάζει τον αριθμό, την κατανομή και το βαθμό ενεργοποίησης των κυτταρικών πληθυσμών του GALT (Gabriel και συν., 2006). Πιο αναλυτικά, ο αριθμός των  $\alpha\beta$ -T λεμφοκυττάρων, των πλασματοκυττάρων, της IgA και των ενδοεπιθηλιακών κυττάρων είναι μικρότερος στα αξενικά ζώα, συγκριτικά με τα εμπορικά (Dibner και συν., 2008). Επίσης, οι πλάκες του Payer είναι μικρότερες, περιέχουν λιγότερο λεμφικό ιστό και δεν περιέχουν κέντρα ωρίμανσης (Dibner και συν., 2008).

Η εντερική μικροχλωρίδα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διάσπαση ουσιών, οι οποίες δεν μπορούν διασπαστούν από τα ένζυμα του πεπτικού συστήματος, καθώς και στην παραγωγή θρεπτικών συστατικών από αυτές. Πρόκειται κυρίως για υδατάνθρακες, όπως οι μη σακχαροειδείς πολυσακχαρίτες (ΜΣΠ), οι οποίοι δεν διασπώνται από τα ένζυμα του πεπτικού συστήματος των πτηνών, αλλά διασπώνται από τα ένζυμα πέψης της εντερικής μικροχλωρίδας, με αποτέλεσμα την παραγωγή ΒΑΛΟ, ύδατος, αερίων ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ) και βακτηριακής βιομάζας (Gabriel και συν., 2006).

Τα ΒΑΛΟ μπορούν να απορροφηθούν από το γαστρεντερικό βλεννογόνο και να χρησιμοποιηθούν για τη σύνθεση κετονικών σωμάτων (κυρίως το βουτυρικό), γλυκόζης (κυρίως το προπιονικό) και λιπιδίων (κυρίως το ακετοξικό). Επίσης, ρυθμίζουν έμμεσα τη λειτουργία του πεπτικού συστήματος, διεγείροντας την παραγωγή ιντερλευκίνης-8 (IL-8) από τα επιθηλιακά κύτταρα (Koutsos και Arias, 2006). Τέλος, αποτελούν ενεργειακή πηγή για τα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα και επηρεάζουν την έκκριση χολής και την εκκριτική δραστηριότητα του εντερικού βλεννογόνου και της εξωκρινούς μοίρας του παγκρέατος (Mroz και συν., 2006).

Η εντερική μικροχλωρίδα συμμετέχει ενεργά στο μεταβολισμό των αζωτούχων ουσιών του ξενιστή, αξιοποιώντας κυρίως το ουρικό οξύ, το οποίο επαναπροωθείται στα τυφλά με αντιπερισταλτικές κινήσεις. Το ουρικό οξύ και τα αζωτούχα συστατικά του σιτηρεσίου, που φθάνουν στα τυφλά, μεταβολίζονται σε αμμωνία και ΒΑΛΟ, τα οποία και απορροφώνται (Gabriel και συν., 2006). Η εντερική μικροχλωρίδα, επίσης, λαμβάνει μέρος στην παραγωγή βλέννης από το γαστρεντερικό βλεννογόνο και στο μεταβολισμό της, συμμετέχοντας με αυτόν τον τρόπο στην ανακύκλωσή της και στην εξοικονόμηση ενέργειας και πρωτεϊνών προς όφελος του ξενιστή (Gabriel και συν., 2006).

Εκτός από τα παραπάνω οφέλη, η δραστηριοποίηση της εντερικής μικροχλωρίδας έχει και αρνητικές συνέπειες για τον ξενιστή. Πιο αναλυτικά, οι πρωτεϊνικές ανάγκες των εμπορικά εκτρεφόμενων πτηνών είναι μεγαλύτερες, συγκριτικά με τις ανάγκες των αξενικών πτηνών. Η παρουσία των μικροοργανισμών της εντερικής μικροχλωρίδας αυξάνει τη σύνθεση πρωτεϊνών στο ήπαρ κατά 25% (για μεταβολισμό και αποτοξίκωση από τα βακτηριακά

προϊόντα) και στο έντερο κατά 45% (Gabriel και συν., 2006). Επιπλέον, ορισμένα βακτήρια της εντερικής μικροχλωρίδας ανταγωνίζονται τον ξενιστή ως προς τα αμινοξέα, τα οποία τα χρησιμοποιούν προς όφελός τους και παράγουν τοξικούς μεταβολίτες, όπως την αμμωνία, τις αμίνες, τις φαινόλες και τις ινδόλες (Gaskins, 2001).

Η εντερική μικροχλωρίδα δεν ανταγωνίζεται μόνο με τα παθογόνα βακτήρια για τα θρεπτικά συστατικά, αλλά ανταγωνίζεται και τον ίδιο τον ξενιστή. Επίσης, επιταχύνει το ρυθμό ανανέωσης των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων, αυξάνει την εκκριτική δραστηριότητα του εντερικού βλεννογόνου και διεγείρει το ανοσοποιητικό σύστημα (Dibner και Richards, 2005). Όλα τα παραπάνω απαιτούν την κατανάλωση ενέργειας σε βάρος του ξενιστή. Για παράδειγμα, παρά το γεγονός ότι ο γαστρεντερικός σωλήνας του χοίρου αντιπροσωπεύει μόνο το 5% του ΣΒ του, καταναλώνει το 15-30% του οξυγόνου και των πρωτεϊνών για την αντικατάσταση των επιθηλιακών του κυττάρων. Επιπλέον, το 90% της συνολικής πρωτεΐνης που συντίθεται στο γαστρεντερικό σωλήνα αποβάλλεται με τη βλέννη και τα αποπίπτοντα επιθηλιακά κύτταρα. Επίσης, το 50% της IgA δρα στους μικροοργανισμούς της φυσιολογικής εντερικής μικροχλωρίδας (Gaskins, 2001). Τα πτηνά, που εκτρέφονται σε περιβάλλον κατά το δυνατόν απαλλαγμένο από παθογόνους παράγοντες, αναπτύσσονται ταχύτερα κατά 15%, συγκριτικά με πτηνά που εκτρέφονται σε συμβατικές συνθήκες (Klasing και συν., 1987). Από τα παραπάνω, φαίνεται ότι η εντερική μικροχλωρίδα αποτελεί διατροφική και ενεργειακή τροχοπέδη για τα ταχέως αναπτυσσόμενα πτηνά (Dibner και Richards, 2005; Lan και συν., 2005).

## **2. ΝΕΚΡΩΤΙΚΗ ΕΝΤΕΡΙΤΙΔΑ**

### **2.1 Γενικά**

Η ΝΕ οφείλεται στο *C. perfringens* τύπου Α ή C, το οποίο προσβάλλει τα κρεοπαραγωγά ορνίθια, προκαλώντας υψηλή θνητότητα με χαρακτηριστικές και σοβαρές αλλοιώσεις (Immerseel και συν., 2004). Αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1930 από τον Bennetts στην Αυστραλία (Bennetts, 1930). Ο Bennetts απομόνωσε το *Bacillus welchii* (*Clostridium welchii*: *Clostridium perfringens*) από αλλοιώσεις στον εντερικό βλεννογόνο όρνιθας και απέδωσε το θάνατό της σε αυτό. Το νόσημα αναπαράχθηκε πειραματικά και περιγράφηκε πλήρως από τον Parish το 1961 στο HB (Parish, 1961).

Τα επόμενα χρόνια, έως και το 1997, η σημασία που δόθηκε στη ΝΕ παγκοσμίως ήταν περιορισμένη (Williams, 2005). Σήμερα αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα αναδυόμενα νοσήματα που απασχολούν παγκοσμίως τη συστηματική πτηνοτροφία. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι εκτός από τη σημαντική επίδραση στην οικονομικότητα της εκτροφής, την υγεία και την ευζωία των πτηνών, αποτελεί κίνδυνο και για τη δημόσια υγεία (Van der Sluis, 2000: Immerseel και συν., 2004). Συγκεκριμένα, η τροφογενής λοίμωξη των ανθρώπων από *C. perfringens* κατείχε την τρίτη σε σειρά συχνότητας λοίμωξη στις βιομηχανικές χώρες (Johnson, 1989).

### **2.2 Οικονομικές επιπτώσεις**

Η ΝΕ αποτελεί νόσημα με σημαντικές οικονομικές επιπτώσεις για την παγκόσμια πτηνοτροφία. Οι Shane και Van der Sluis (2002) υπολόγισαν ότι το κόστος των μεθόδων ελέγχου όλων των λοιμωδών νοσημάτων των πτηνών στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής (ΗΠΑ) ανέρχεται περίπου στα \$3 δισεκατομμύρια δολάρια το χρόνο. Ειδικότερα, η ΝΕ έχει υπολογιστεί ότι κοστίζει \$0,05 ανά κρεοπαραγωγό ορνίθιο στις ΗΠΑ και συνολικά \$2 δισεκατομμύρια δολάρια παγκοσμίως (Van der Sluis, 2000). Επίσης, το κέρδος για τους εκτροφείς κρεοπαραγωγών ορνιθίων μειώνεται κατά 33%, όταν η συχνότητα εμφάνισης ΝΕ στο σμήνος είναι υψηλή, λόγω της μείωσης των αποδόσεων των πτηνών (Lovland και Kaldhusdal, 2001).

Οι δυσμενείς οικονομικές επιπτώσεις της ΝΕ στην εκτροφή οφείλονται κατά κύριο λόγο στη μείωση των αποδόσεων των πτηνών που παρατηρείται κατά την υποκλινική της μορφή και σε μικρότερο βαθμό στο υψηλό ποσοστό θνητότητας που παρατηρείται κατά την κλινική της μορφή (Stutz και Lawton, 1984: Lovland και Kaldhusdal, 2001).



Στη διαμόρφωση του κόστους της ΝΕ συμβάλλει και η ποιοτική υποβάθμιση των σφαγίων των κρεοπαραγωγών ορνιθίων, με αποτέλεσμα την απόρριψή τους, κατά τον κρεοσκοπικό έλεγχο που διενεργείται στο σφαγείο (Lovland και Kaldhusdal, 1999). Η υποβάθμιση των ποιοτικών χαρακτηριστικών και η απόρριψη των σφαγίων έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του κέρδους για τον παραγωγό κατά 25% (Lovland και Kaldhusdal, 2001).

Τέλος, σημαντική επίδραση στη διαμόρφωση των δυσμενών οικονομικών επιπτώσεων της ΝΕ έχει η χορήγηση φαρμακευτικών ουσιών και πρόσθετων υλών που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία και για την πρόληψη, αντίστοιχα (McDevitt και συν., 2006).

### **2.3 Αιτιολογία**

Τα κλωστρίδια εμφανίστηκαν ως ξεχωριστή κλάση πριν το σχηματισμό του οξυγόνου στην ατμόσφαιρα της γης, περίπου πριν από 2,7 δισεκατομμύρια χρόνια. Τα περισσότερα είδη ζουν σαπροφυτικά στη φύση, στα ζώα και σε υλικά σε αποσύνθεση και είναι ακίνδυνα. Περισσότερα από 25 είδη είναι δυνητικά παθογόνα, ενώ 13 χαρακτηρίζονται ως ιδιαίτερα παθογόνα. Τα τελευταία παράγουν 59 διαφορετικές τοξίνες, με σημαντικότερες την τοξίνη που προκαλεί τον τέτανο και την τοξίνη της αλλαντίασης, καθιστώντας το *Clostridium* spp. ως το πλέον τοξινογόνο βακτηριακό γένος (Collins και συν., 1994; Johansson, 2006).

Το *Clostridium* spp. κατατάσσεται στο βασίλειο *Bacteria*, στο φύλο *Firmicutes*, στην κλάση *Clostridia*, στην τάξη *Clostridiales* και στην οικογένεια *Clostridiaceae* (Johansson, 2006). Αποτελείται από μεγάλα, ραβδίομορφα, υποχρεωτικά αναερόβια, σπορογόνα, Gram-θετικά βακτήρια (Cato και συν., 1986; Quinn και συν., 1994) και περιλαμβάνει περισσότερα από 200 είδη (<http://www.bacterio.cict.fr/c/clostridium.html>). Τα περισσότερα είδη προκαλούν ζύμωση σε σάκχαρα ή σε αμινοξέα ή και στα δύο (Brock και συν., 1994). Στα τελικά προϊόντα της ζύμωσης περιλαμβάνονται η ακετόνη, το βουτυρικό οξύ, η βουτανόλη και άλλες αλκοόλες, τα οποία προσδίδουν την οσμή σήψης στο υπόστρωμα ανάπτυξης (Biberstein, 1990).

Τα κλωστρίδια, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που είναι παθογόνα για τον άνθρωπο και τα ζώα, εμφανίζουν μεγάλη διασπορά στη φύση. Αυτό οφείλεται στην ικανότητά τους να σπορογονούν, κάνοντάς τα ιδιαίτερα ανθεκτικά σε δυσμενείς συνθήκες περιβάλλοντος, όπως είναι οι ακραίες τιμές θερμοκρασίας και pH, η έλλειψη οξυγόνου κ.ά. (Johansson, 2006).

Ο William H. Welch το 1890 απομόνωσε για πρώτη φορά το *C. perfringens* από έναν ασθενή, ο οποίος πέθανε 8 ώρες νωρίτερα από επιπλοκές (Lucey και Hutchins, 2004). Κατά

τη μικροσκοπική εξέταση, περιέγραψε ένα βακτήριο που έμοιαζε με το βάκιλλο του άνθρακα, αλλά είχε ορθογώνια άκρα και βρισκόταν πάντα σε ζεύγη ή μεμονωμένα και ποτέ σε αλυσίδες. Προς τιμήν του επιστήμονα που το ανακάλυψε και λόγω των μορφολογικών του χαρακτηριστικών, αρχικά ονομάστηκε *Bacillus welchii*, στη συνέχεια άλλαξε σε *Clostridium welchii* και αργότερα μετονομάστηκε σε *Clostridium perfringens* (Johansson, 2006).

Το *C. perfringens* είναι σχετικά μεγάλο (1,3-1,9×0,6-2,4μm), ανθεκτικό σε μικρές ποσότητες ατμοσφαιρικού οξυγόνου, ευθύγραμμο, ραβδιόμορφο Gram-θετικό βακτήριο (Hatheway, 1990). Κινείται με τη βοήθεια λαχνών τύπου IV (Varga και συν., 2006) ή είναι ακίνητο (Biberstein, 1990). Στο αιματούχο υπόστρωμα σχηματίζει κυκλικές, λείες και στιλπνές αποικίες, οι οποίες περιβάλλονται από χαρακτηριστική, διπλή ζώνη αιμόλυσης. Η εσωτερική, καθαρή ζώνη πλήρους αιμόλυσης οφείλεται στην τοξίνη -θ, ενώ η εξωτερική, ατελής ζώνη αιμόλυσης οφείλεται στην τοξίνη -α (Quinn και συν., 1994).

Είναι μεσόφιλο βακτήριο και αναπτύσσεται σε θερμοκρασία 12-50 °C, με ιδανικό εύρος ανάπτυξης να κυμαίνεται μεταξύ 37-45 °C (Quinn και συν., 1994: Johansson, 2006). Η θερμοκρασία των 45 °C χρησιμοποιείται για την απομόνωση του βακτηρίου από μικτές καλλιέργειες, επειδή σε αυτή τη θερμοκρασία αναπτύσσεται πολύ πιο γρήγορα (χρόνος γενεάς 8-10 λεπτών) από τα άλλα βακτήρια που συνυπάρχουν (Hatheway, 1990). Ρευστοποιεί τη ζελατίνη και προκαλεί ζύμωση στη γλυκόζη, τη λακτόζη, τη μαλτόζη και στη σουκρόζη, αλλά όχι στη μαννιτόλη. Τα κύρια προϊόντα της ζύμωσης είναι το ακετοξικό και το βουτυρικό οξύ. Λόγω της ζύμωσης της λακτόζης, της παραγωγής αερίων και της πήξης, αλλά όχι της πέψης της καζεΐνης, παρατηρείται το φαινόμενο της θυελλώδους ζύμωσης του γάλακτος (Hatheway, 1990: Wages και Opengart, 2003). Πολλά στελέχη *C. perfringens* είναι ικανά να αναπτύσσονται σε pH που κυμαίνεται από 5,5 έως 8. Τα περισσότερα στελέχη είναι ευαίσθητα στις πενικιλίνες, αλλά ανθεκτικά στις αμινογλυκοσίδες (Krieg, 1984).

Η ικανότητα του *C. perfringens* να σπορογονεί, το καθιστά ως το πιο διαδομένο παθογόνο βακτήριο στη φύση (Songer, 1996). Ανευρίσκεται σε κάθε πιθανή περιοχή πάνω στη γη, με εξαίρεση την έρημο της Σαχάρας. Συγκεκριμένα, απομονώνεται από το έδαφος, τις υδατοσυλλογές και τους ιστούς που βρίσκονται σε κατάσταση αποσύνθεσης. Επίσης, αποτελεί μέρος της φυσιολογικής εντερικής μικροχλωρίδας των θερμόαιμων ζώων και του ανθρώπου (Rood και Cole, 1991: Petit και συν., 1999).

Το 2002 ολοκληρώθηκε η διαδικασία ανάγνωσης της αλληλουχίας του γονιδιώματος του στελέχους 13 *C. perfringens*. Το γονιδίωμά του περιλαμβάνει ένα χρωμόσωμα, το οποίο αποτελείται από 3.031.430 ζεύγη βάσεων, 2.660 περιοχές που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, 10

rRNA γονίδια και η περιεκτικότητα του σε γουανίνη-κυτοσίνη (G+C) είναι 28% (Shimizu και συν., 2002).

Η ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδιώματος του *C. perfringens* παρείχε τη δυνατότητα για την καλύτερη μελέτη των μηχανισμών που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του. Συγκεκριμένα, απαντάται μία σειρά γονιδίων, τα οποία είναι υπεύθυνα για τη γλυκοσυλίωση και το μεταβολισμό του γλυκογόνου. Δεν υπάρχουν γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, οι οποίες να εμπλέκονται στον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος, όπως είναι τυπικό για τα αναερόβια βακτήρια. Για αυτόν το λόγο, τα κλωστρίδια προκαλούν ζύμωση στο πυρροβικό οξύ με παραγωγή ακετυλο-συνενζύμου Α (acetyl-CoA), υδρογόνου και διοξειδίου του άνθρακα. Η παραγωγή των αερίων αυτών συμβάλλει στη διατήρηση του αναερόβιου περιβάλλοντος, το οποίο είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό του *C. perfringens* (Shimizu και συν., 2002).

Το πυρροβικό οξύ μπορεί επίσης να μετατραπεί σε γαλακτικό οξύ και acetyl-CoA και στη συνέχεια σε αιθανόλη, οξικό οξύ και βουτυρικό οξύ. Η αναερόβια αυτή γλυκοσυλίωση αποτελεί την κύρια πηγή ενέργειας για το *C. perfringens*. Το *C. perfringens* χρησιμοποιεί πολλά σάκχαρα ως υπόστρωμα άνθρακα με τη βοήθεια διάφορων ενζύμων και με τον τρόπο αυτό διευκολύνεται η ανάπτυξή του (Shimizu και συν., 2002).

Από το *C. perfringens*, σε αντίθεση με τα άλλα είδη του γένους, απουσιάζει μεγάλος αριθμός γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τη βιοσύνθεση 13 αμινοξέων (Petit και συν., 1999: Cooper και Songer, 2009). Συγκεκριμένα, υπολείπονται τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση της αργινίνης, της βαλίνης, της λευκίνης, της ισολευκίνης, των αρωματικών αμινοξέων, του γλουταμινικού οξέος, της ιστιδίνης, της λυσίνης, της μεθειονίνης, της σερίνης και της θρεονίνης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, να μην μπορεί να αναπτυχθεί σε περιβάλλον όπου δεν υπάρχουν τα παραπάνω αμινοξέα. Ωστόσο, *in vivo*, με τη βοήθεια της δράσης των τοξινών του, προκαλεί λύση των κυττάρων και καταστροφή των ιστών, με στόχο την αξιοποίησή τους ως πηγή ενέργειας και αμινοξέων (Cooper και Songer, 2009).

Τα παθογόνα στελέχη *C. perfringens* δεν έχουν τη δυνατότητα να εισβάλλουν στα κύτταρα του ξενιστή, αλλά αναστέλλουν βασικές λειτουργίες στα κύτταρα-στόχος. Αυτό επιτυγχάνεται με τη δράση των τοξινών του, οι οποίες προκαλούν κυτταρική βλάβη με τις ενζυματικές τους δραστηριότητες και τις λυτικές τους ιδιότητες (Frey και Vileie, 2003).

Πολλά είδη βακτηρίων έχουν την ικανότητα να παράγουν τοξίνες, αλλά κανένα τόσες πολλές όσες το *C. perfringens* (Hatheway, 1990). Παράγει τουλάχιστον 17 τοξικές ή δυνητικά τοξικές εξωπρωτεΐνες, οι οποίες μπορεί να έχουν αθροιστική ή συνεργική δράση, προκαλώντας πολυάριθμες παθολογικές καταστάσεις στους ξενιστές (Songer, 1996).

Οι τοξίνες του *C. perfringens* μπορούν να ταξινομηθούν σε κύριες, σε δευτερεύουσες και σε εντεροτοξίνες. Οι κύριες τοξίνες είναι η άλφα (-α), η βήτα (-β), η έψιλον (-ε) και η γιώτα (-ι), όλες δυνητικά θανατηφόρες, ανάλογα με τον ξενιστή. Οι εντεροτοξίνες προκαλούν επιθηλιακή βλάβη. Όλες οι υπόλοιπες τοξίνες κατατάσσονται στην κατηγορία των δευτερευόντων τοξινών (Sakurai και συν., 1997; Gatsos, 2007).

Τα είδη του *C. perfringens*, ανάλογα με την παραγωγή των τεσσάρων κύριων τοξινών (-α, -β, -ε και -ι), ταξινομούνται σε πέντε τοξινικούς τύπους-βιότυπους: Α, Β, C, D και Ε. Ο τύπος Α είναι ο επικρατέστερος και πιο διαδεδομένος και παράγει μόνο την τοξίνη -α. Ο τύπος Β παράγει τις τοξίνες -α, -β και -ε, ο τύπος C τις τοξίνες -α και -β, ο τύπος D τις τοξίνες -α και -ε και ο τύπος Ε τις τοξίνες -α και -ι. Όλοι οι τύποι είναι ικανοί να παράγουν τοξίνη -α (Brooks και συν., 1957; Songer, 1996).

Η ταξινόμηση του *C. perfringens* σε τοξινικούς τύπους είναι χρήσιμη για κλινικούς σκοπούς, αλλά δεν απεικονίζει τη γενετική συγγένεια μεταξύ των τοξινών (Tsutsui και συν., 1995). Ενδεχομένως να υπάρχουν και άλλες τοξίνες, οι οποίες δεν έχουν ακόμη ταυτοποιηθεί. Επίσης, οι δράσεις των τοξινών, κύριων και δευτερευουσών, σε ορισμένα νοσήματα δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί (Immerseel και συν., 2009).

Τα γονίδια του *C. perfringens*, που κωδικοποιούν τις τοξίνες, μπορεί να εντοπίζονται στο χρωμόσωμα ή σε περιοχές εκτός αυτού (Gatsos, 2007). Η εντόπιση των γονιδίων αυτών σε διάφορες περιοχές του χρωμοσώματος ή μεταθετών του στοιχείων (πλασμιδίων, τρανσποζονίων και πιθανόν φάγων) συμβάλλει στην ποικιλία των τοξινικών τύπων. Η απόκτηση ή/και η απώλεια πλασμιδίων, που πιθανόν να συμβεί κατά την ανακαλλιέργεια των τύπων Β, C, D και Ε, πιθανόν να οδηγήσει σε αλλαγή του τύπου (Petit και συν., 1999).

#### **2.4 Παθογένεια**

Τα υγιή κρεοπαραγωγά ορνίθια μπορούν να φέρουν από δύο έως και πέντε διαφορετικούς κλώνους *C. perfringens* τύπου Α (Nauerby και συν., 2003; Barbara και συν., 2008). Αντίθετα, από ορνίθια με κλινική ή υποκλινική ΝΕ απομονώνεται συνήθως μόνο ένας κλώνος, ο οποίος τις περισσότερες φορές είναι διαφορετικός από τους κλώνους των υγιών πτηνών (Engstrom και συν., 2003; Nauerby και συν., 2003). Η κυριαρχία αυτή είναι πιθανόν το αποτέλεσμα της παραγωγής και της έκκρισης βακτηριοσινών από τα βακτήρια, επειδή τα στελέχη που απομονώνονται από περιστατικά ΝΕ αναστέλλουν *in vitro* την ανάπτυξη στελεχών από υγιή πτηνά (Barbara και συν., 2008). Μετά την ανάρρωση ή τη θεραπεία, τα πτηνά επανακτούν πάλι πολλούς και διαφορετικούς κλώνους, όπως και τα υγιή (Nauerby και συν., 2003; Barbara και συν., 2008).

Η ΝΕ στα κρεοπαραγωγά ορνίθια εκδηλώνεται συνήθως στην ηλικία των 2 με 6 εβδομάδων και συνηθέστερα στις 3-4 εβδομάδες (Long, 1973α: Engstrom και συν., 2003: Lovland και συν., 2004). Έως τις 2 εβδομάδες, η περιεκτικότητα του γαστρεντερικού σωλήνα των ορνιθίων σε οξυγόνο είναι σχετικά υψηλή και δεν ευνοεί τον υπέρμετρο πολλαπλασιασμό των αναερόβιων βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένου και του *C. perfringens*. Μετά τις 2 εβδομάδες, το περιβάλλον γίνεται αναερόβιο, ευνοώντας την εκδήλωση της ΝΕ (Kocher και Choct, 2008). Επίσης, μετά τη δεύτερη εβδομάδα, παρατηρείται κενό ανοσίας, το οποίο οφείλεται στο γεγονός ότι το ανοσοποιητικό σύστημα των πτηνών ωριμάζει στις 3-4 εβδομάδες (La Ragione και Woodward, 2003), ενώ η διάρκεια της μητρικής ανοσίας υπολογίζεται συνήθως στις 2-3 εβδομάδες (Heier και συν., 2001: Lovland και συν., 2003).

Η επιστημονική κοινότητα, για περισσότερα από 30 χρόνια, θεωρούσε ότι η τοξίνη -α αποτελεί τον κύριο παθογόνο παράγοντα για την πρόκληση των αλλοιώσεων της ΝΕ στα κρεοπαραγωγά ορνίθια (Al-Sheikhly και Truscott, 1977α, β, γ). Η υπόθεση αυτή βασίστηκε στο γεγονός ότι η μόλυνση με το ακατέργαστο υπερκείμενο υγρό (Al-Sheikhly και Truscott, 1977α) ή της ακατέργαστης τοξίνης -α (Al-Sheikhly και Truscott, 1977γ) από την καλλιέργεια *C. perfringens* τύπου Α, ήταν σε θέση να προκαλέσει αλλοιώσεις ΝΕ στον εντερικό βλεννογόνο των κρεοπαραγωγών ορνιθίων. Επίσης, οι Fukata και συν. (1988) απέδειξαν ότι αντισώματα κατά της τοξίνης -α εξουδετέρωσαν την επίδραση της θανατηφόρας μόλυνσης με το υπερκείμενο υγρό της καλλιέργειας *C. perfringens* σε πειραματικό μοντέλο πρόκλησης ΝΕ σε αξενικά ορνίθια.

Ωστόσο, η ερμηνεία των αποτελεσμάτων των παραπάνω μελετών παρουσιάζει κάποιες αδυναμίες. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι σε όλες τις μελέτες χρησιμοποιήθηκε το υπερκείμενο υγρό της καλλιέργειας του *C. perfringens* και οι βιολογικές του δράσεις αποδόθηκαν στο κυρίαρχο συστατικό του, την τοξίνη -α, αγνοώντας παντελώς την ύπαρξη και τη δράση των άλλων συστατικών που συνυπάρχουν (Immerseel και συν., 2009).

Έχει πλέον αποδειχθεί, ότι η τοξίνη -α δεν αποτελεί απαραίτητο παθογόνο παράγοντα για την πρόκληση αλλοιώσεων ΝΕ (Keyburn και συν., 2006). Το πιο σημαντικό δεδομένο, στο οποίο βασίζεται η παραπάνω άποψη, είναι ότι στελέχη *C. perfringens* από τα οποία αφαιρέθηκε το γονίδιο που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της τοξίνης -α (*cpa*), διατήρησαν την ικανότητα να προκαλούν τις χαρακτηριστικές αλλοιώσεις της ΝΕ στον εντερικό βλεννογόνο. Επίσης, τόσο το αρχικό όσο και το μεταλλαγμένο στέλεχος (mutant *cpa* strain) ήταν ικανά να αναπαράγουν το νόσημα σε πειραματικές συνθήκες (Keyburn και συν., 2006).

Ένα επιπλέον στοιχείο, το οποίο υποβαθμίζει το ρόλο της τοξίνης -α στην παθογένεια της ΝΕ, είναι η ιστοπαθολογική εικόνα των αλλοιώσεων. Κύριο χαρακτηριστικό της ιστοπαθολογικής εικόνας της ΝΕ είναι η φλεγμονή των προσβεβλημένων ιστών που συνοδεύεται από έντονη διήθηση λευκοκυττάρων (Long και συν., 1974: Olkowski και συν., 2006: Gholamiandekhordi και συν., 2007). Αντίθετα, σε παθολογικές καταστάσεις, που αποδεδειγμένα οφείλονται στην τοξίνη -α, όπως η κακοήθης γάγγραινα (Williamson και Titball, 1993), δεν παρατηρείται φλεγμονή και μετανάστευση λευκοκυττάρων (Bryant και συν., 2006).

Για την ερμηνεία της παθογένειας της ΝΕ έχουν ανακαλυφθεί και προταθεί νέες τοξίνες (Keyburn και συν., 2008: Kulkarni και συν., 2008), χωρίς ωστόσο καμία από αυτές *per se* να μπορεί να την αιτιολογήσει πλήρως (Cooper και Songer, 2009).

Η αποτελεσματικότητα των εμβολίων ανατοξίνης -α (Lovland και συν., 2004: Kulkarni και συν., 2007), η υψηλή συγκέντρωση της τοξίνης αυτής τόσο στο υπερκείμενο υγρό της καλλιέργειας *C. perfringens* (Al-Sheikhly και Truscott, 1977γ) όσο και στα κόπρανα των πτηνών με ΝΕ (Gholamiandekhordi και συν., 2006), καθώς επίσης και οι υψηλοί τίτλοι αντισωμάτων κατά της τοξίνης -α σε πτηνά με ΝΕ (Heier και συν., 2001) υποδηλώνουν ότι η τοξίνη -α σίγουρα διαδραματίζει κάποιο ρόλο, πρωταγωνιστικό ή μη, στην παθογένεια της ΝΕ (Kulkarni και συν., 2007: Cooper και συν., 2009).

Είναι πιθανό, στην πολύπλοκη παθογένεια της ΝΕ να εμπλέκονται και άλλοι παράγοντες, όπως υδρολυτικά ένζυμα ή ακόμη και τοξίνες οι οποίες δεν έχουν ακόμη αναγνωριστεί. Τα νεότερα δεδομένα κάνουν επιτακτική την ανάγκη για επαναξιολόγηση του ρόλου της τοξίνης -α στην παθογένεια της ΝΕ και των μελετών που βασίστηκαν σε αυτήν και ταυτόχρονα ανοίγουν το δρόμο για την αναζήτηση και άλλων παραγόντων που πιθανόν να εμπλέκονται στην παθογένειά της (Immerseel και συν., 2009).

## **2.5 Μετάδοση**

Το *C. perfringens* αποτελεί μέλος της φυσιολογικής εντερικής μικροχλωρίδας σχεδόν όλων των θερμόαιμων ζώων. Το 75-95% των ορνιθίων φέρουν το *C. perfringens* στην εντερική μικροχλωρίδα, χωρίς ωστόσο να εκδηλώνουν το νόσημα (Shane και συν., 1984: Miwa και συν., 1997). Εντοπίζεται κυρίως στα τυφλά και σε μικρότερο βαθμό στη νήστιδα και τον ειλεό, σε πληθυσμό που φυσιολογικά ανέρχεται από τις  $10^2$  έως τις  $10^4$  cfu/g εντερικού περιεχομένου (Shane και συν., 1984: Baba και συν., 1997).

Λόγω της ευρείας διασποράς του *C. perfringens* στο περιβάλλον, η μόλυνση των ορνιθίων γίνεται σε πολύ νεαρή ηλικία (Craven και συν., 2001α, β). Σύμφωνα με τον Smith

(1965), το *C. perfringens* μαζί με το *E. coli* και τους στρεπτόκοκκους είναι τα πρώτα βακτήρια που αποικίζουν το γαστρεντερικό σωλήνα των ορνιθίων.

Η μετάδοση μπορεί να είναι οριζόντια ή και κάθετη στο εκκολαπτήριο (Craven και συν., 2001α, β: 2003). Για την οριζόντια μετάδοση έχουν ενοχοποιηθεί τα τροφικά και τα άγρια πτηνά και κυρίως αυτά που διαβιούν στον περιβάλλοντα χώρο του πτηνοτροφείου (Craven και συν., 2000), καθώς επίσης και η οικόσιτη μύγα *Musca domestica* (Dhillon και συν., 2004). Ωστόσο, δεν έχει διευκρινιστεί εάν πρόκειται για μεταδότες ή για μεταφορείς. Για την εκδήλωση της ΝΕ έχει επίσης ενοχοποιηθεί η επιμόλυνση της τροφής με *C. perfringens* ή με σπόρους αυτού (Frame και Bickford, 1986).

Οι νεοσσοί κρεοπαραγωγών ορνιθίων συστηματικής εκτροφής κατά τις πρώτες ημέρες της ζωής τους εκτίθενται σε πολύ μικρότερο αριθμό μικροοργανισμών, συγκριτικά με τα ελεύθερα διαβιούντα πτηνά. Η μείωση του μικροβιακού φορτίου οφείλεται στο σύστημα διαχείρισης «all in - all out» και στα προγράμματα καθαρισμού και απολύμανσης που εφαρμόζονται στα σύγχρονα πτηνοτροφεία. Επίσης, στη μείωση του μικροβιακού φορτίου συμβάλλει και η τήρηση αυστηρών μέτρων βιοασφάλειας που εφαρμόζονται στα σύγχρονα εκκολαπτήρια. Όλα τα παραπάνω έχουν ως αποτέλεσμα, να περιορίζεται ποιοτικά και ποσοτικά η εντερική μικροχλωρίδα και να δίνεται η δυνατότητα σε δυνητικά παθογόνα βακτήρια, όπως το *C. perfringens*, να αποικίσουν το γαστρεντερικό σωλήνα των ορνιθίων (Morrow, 2001).

Σύμφωνα με τους Craven και συν. (2001 α, β: 2003), η μόλυνση των ορνιθίων από το *C. perfringens* ξεκινάει από το εκκολαπτήριο ή ακόμη νωρίτερα από τα πατρογονικά σμήνη, συνεχίζεται στο πτηνοτροφείο και ολοκληρώνεται στο πτηνοσφαγείο. Συγκεκριμένα, σε μελέτη που διενεργήθηκε σε δείγματα από το εκκολαπτήριο, από τα κιβώτια μεταφοράς των νεοσσών, από τα υλικά του πτηνοτροφείου, από τους κλωβούς μεταφοράς των πτηνών στο πτηνοσφαγείο και από το πτηνοσφαγείο απομονώθηκε, αντίστοιχα, *C. perfringens* από το κέλυφος των αυγών, τη σκόνη του εκκολαπτηρίου, τα κιβώτια μεταφοράς των νεοσσών, τα κόπρανα των πτηνών, το σύστημα υδροδότησης, τον εξαερισμό, τους τοίχους, τη στρωμνή, τα έντομα, τα ενδύματα και τα υποδήματα του προσωπικού του πτηνοτροφείου, καθώς επίσης από τα κιβώτια μεταφοράς, τη δεξαμενή αποπίλωσης και τα κρεατοσκευάσματα (Craven και συν., 2001 α, β: 2003).

Η ταυτοποίηση των στελεχών *C. perfringens* που απομονώθηκαν, με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), φανερώνει ότι τα πατρογονικά σμήνη και τα εκκολαπτήρια αποτελούν σημαντική πηγή μόλυνσης (Craven και συν., 2001 α, β). Η συσχέτιση των στελεχών θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στην κατάρτιση προγραμμάτων

ελέγχου και πρόληψης της NE. Το *C. perfringens* στα εκκολαπτήρια προέρχεται είτε από τα πατρογονικά σμήνη είτε από τα έντομα, τα αντικείμενα και τη σκόνη του εκκολαπτηρίου. Επίσης, ορισμένα εκκολαπτήρια περισυλλέγουν και επαναχρησιμοποιούν τα κιβώτια μεταφοράς, πρακτική η οποία ενέχει πολλούς κινδύνους, όχι μόνο για μόλυνση με *C. perfringens* αλλά και με άλλα παθογόνα βακτήρια (Craven και συν., 2001α).

## **2.6 Επιδημιολογία**

Η NE αποτελεί πρόβλημα κυρίως των εκτροφών κρεοπαραγωγών ορνιθίων (Lovland και Kaldhusdal, 2001). Ωστόσο, έχει περιγραφεί και σε αβγοπαραγωγές όρνιθες και σε γεννήτορες (Brousard και συν., 1986). Επιπλέον, έχει περιγραφεί στη στρουθοκάμηλο (*Struthio camelus*) (Kwon και συν., 2004), στην ινδόρνιθα (*Meleagris gallopavo*) (Gazdzinski και Julian, 1992: Droual και συν., 1995), στο ορτύκι (*Coturnix coturnix*) (Berkhoff, 1985), στην αγριόχηνια (*Branta canadensis*, *Anser caerulescens caerulescens*) (Wobeser και Rainnie, 1987), στο γλάρο (*Corvus macrorhynchos*) (Asaoka και συν., 2004), στην πέρδικα (*Centrocercus urophasianus*) (Hagen και Bildfell, 2007), στον αγριόγαλο (*Tetrao urogallus*) (Stuve και συν., 1992) και σε καλλωπιστικά πτηνά, όπως τα Iories (*Eos bounea*) (O'Toole και συν., 1993).

Δεν υπάρχουν επαρκή επιδημιολογικά δεδομένα για τη συχνότητα εμφάνισης της NE, με αποτέλεσμα ο επιπολασμός της στα σμήνη κρεοπαραγωγών ορνιθίων στις ΗΠΑ και την Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) να κυμαίνεται από 1% έως 40% (Kaldhusal και Lovland, 2000). Συγκεκριμένα, οι Annett και συν. (2002) εκτίμησαν ότι πάνω από το 37% των κρεοπαραγωγών ορνιθίων που εκτρέφονται στη Βόρεια Αμερική έχουν νοσήσει από τη NE. Αντίθετα, σε μία επιδημιολογική έρευνα διάρκειας 20 ετών η οποία διεξήχθη στη Νορβηγία και εκτιμήθηκε η επίδραση της κατάργησης των ΑΑΠ στη συχνότητα εμφάνισης της NE, ο μέσος όρος του ποσοστού προσβολής κυμαινόταν μεταξύ 1-2%, παρόλο που στην εικοσαετία αυτή υπήρξαν επιδημίες NE με διάρκεια 2-5 ετών και επιπολασμό έως 35% (Kaldhusdal και Skjerve, 1996).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της επιδημιολογικής έρευνας των Hermans και Morgan (2007) στο ΗΒ, σχετικά με τον επιπολασμό της NE στα κρεοπαραγωγά ορνιθία, το 12,3% των εκτροφέων ανέφεραν ότι στην τελευταία εκτροφή εκδηλώθηκε NE και σχεδόν το 33% ανέφεραν ότι την περίοδο 2000-2001 εκδηλώθηκε NE σε τουλάχιστο μία εκτροφή. Στις χώρες όπου δεν έχει διενεργηθεί επιδημιολογική έρευνα, ενδεικτικό της συχνότητας εμφάνισης της NE είναι οι πωλήσεις των αντιμικροβιακών ουσιών που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία του νοσήματος (McDevitt και συν., 2006).



Η συγκριτική μελέτη του επιπολασμού της NE μεταξύ των χωρών πρέπει να γίνεται με προσοχή. Η προληπτική χορήγηση ΑΑΠ, ενζύμων και αντικοκκιδιακών φαρμάκων στα σιτηρέσια των κρεοπαραγωγών ορνιθίων, τα οποία επηρεάζουν την εκδήλωση της NE, ποικίλει σημαντικά (Bedford, 2000: McDevitt και συν., 2006). Για παράδειγμα, παρόλο που στη Νορβηγία η χρησιμοποίηση των ΑΑΠ στα κρεοπαραγωγά ορνίθια και ινδορνίθια απαγορεύτηκε το 1995, το ποσοστό των σμηνών στα οποία εφαρμόστηκε θεραπευτική αγωγή κατά της NE ήταν μόνο 3,5% (Grave και συν., 2004). Ωστόσο, το χαμηλό αυτό ποσοστό αποδίδεται στη χρησιμοποίηση του αντικοκκιδιακού φαρμάκου parasine, το οποίο εκδηλώνει ταυτόχρονα και αντικλωστριδιακή δράση και χρησιμοποιήθηκε ευρέως τη συγκεκριμένη περίοδο (McDevitt και συν., 2006). Επίσης, οι διαχειριστικές πρακτικές, οι οποίες επηρεάζουν την εκδήλωση της NE, διαφέρουν από χώρα σε χώρα και πολλές φορές από περιοχή σε περιοχή (Bedford, 2000).

### **2.7 Ανάδυση**

Η NE ως νόσημα είναι γνωστό από το 1930, όπως προαναφέρθηκε, χωρίς ωστόσο να αποτελεί σημαντικό πρόβλημα για τη συστηματική πτηνοτροφία εκείνη την εποχή. Ενδεικτικό είναι το γεγονός ότι δεν αναφερόταν σε οδηγό με τα συχνότερα νοσήματα των ορνιθίων στο HB το 1964 (British Oil και Cake Mills, 1964), ούτε σε παγκόσμια έρευνα για τα συνήθη νοσήματα των πτηνών που διενεργήθηκε το 1979 (Biggs, 1982).

Έξαρση στην εκδήλωση του νοσήματος παρατηρήθηκε μετά το 1986 στις Σκανδιναβικές χώρες (Kaldhusdal και Lovland, 2000) και μετά το 2000 στην υπόλοιπη Ευρώπη. Η έξαρση της NE αποδίδεται στην απαγόρευση της προληπτικής χρησιμοποίησης ΑΑΠ στα σιτηρέσια των κρεοπαραγωγών ορνιθίων (Kaldhusdal και Skjerve, 1996: Kocher, 2003: Williams, 2005). Επιπρόσθετα, στην έξαρση των κλινικών εκδηλώσεων του νοσήματος συνέβαλε και η διακοπή της χρησιμοποίησης των κρεαταλεύρων, οστεαλεύρων και πτηναλεύρων στα σιτηρέσια των κρεοπαραγωγών ορνιθίων και η αντικατάστασή τους από τα ιχθυάλευρα (Mateos και συν., 2002).

#### **2.7.1 Αντιμικροβιακοί αυξητικοί παράγοντες**

Τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται στα σιτηρέσια των ζώων για θεραπευτικούς και προληπτικούς λόγους, καθώς επίσης και ως αυξητικοί παράγοντες, ενισχύοντας τις αποδόσεις τους (Barton, 2000).

Η θετική επίδραση των αντιβιοτικών στο ΣΒ και τη μετατρεψιμότητα της τροφής διαπιστώθηκε για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1940. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε πως όταν

το σιτηρέσιο των πτηνών περιείχε αποξηραμένα μυκήλια του *Streptomyces aureofaciens*, τα οποία περιέχουν tetracycline ως παραπροϊόν ζυμώνσεων, τα πτηνά παρουσίαζαν καλύτερες αποδόσεις (Stokestad και Jukes, 1950). Έκτοτε, καθιερώθηκε η προληπτική χορήγηση αντιβιοτικών σε χαμηλές δόσεις στα σιτηρέσια των πτηνών, με στόχο την αύξηση των αποδόσεων και την προστασία από παθογόνους και μη μικροοργανισμούς που εντοπίζονται κατά κύριο λόγο στο πεπτικό σύστημα (Ferket και συν., 2002).

Η απαγόρευση της χρησιμοποίησης των ΑΑΠ στα σιτηρέσια των πτηνών είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του ΔΜΤ κατά 3-5% (Thomke και Elwinger, 1998). Το Ινστιτούτο Υγείας των Ζώων των ΗΠΑ εκτίμησε ότι σε ενδεχόμενη απαγόρευση των ΑΑΠ θα απαιτούνταν επιπλέον 452 εκατομμύρια ορνίθια, 23 εκατομμύρια μόσχοι και 12 εκατομμύρια χοίροι για να επιτευχθούν επίπεδα παραγωγής ανάλογα με αυτά κατά τη χρησιμοποίηση των ΑΑΠ. Η ενδεχόμενη απαγόρευση των ΑΑΠ θα κόστιζε στους καταναλωτές \$5 έως \$10 δολάρια ανά κάτοικο ετησίως (Phillips και συν., 2004).

Τέλος, η απαγόρευση της χρησιμοποίησης των ΑΑΠ θα είχε σημαντικές επιπτώσεις και στο περιβάλλον. Η υποβάθμιση της μετατρεψιμότητας της τροφής από τα παραγωγικά ζώα θα είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της χορηγούμενης ποσότητας των δημητριακών καρπών και επομένως την αύξηση της απαιτούμενης καλλιεργούμενης γης κατά 810.000 εκτάρια (Phillips και συν., 2004).

### **2.7.2 Μηχανισμός δράσης των ΑΑΠ**

Ο μηχανισμός της δράσης των ΑΑΠ δεν έχει ακόμη πλήρως διαλευκανθεί παρά τη μακρά ιστορία της χρησιμοποίησής τους (Niewold, 2007: Lu και συν., 2008). Για την ερμηνεία της δράσης τους έχουν προταθεί τέσσερις κύριοι μηχανισμοί (Gaskins και συν., 2002: Dibner και Richards, 2005: Page, 2006):

- 1) Η *αναστολή των υποκλινικών μολύνσεων*, με αποτέλεσμα την εξοικονόμηση ενέργειας, λόγω της καλύτερης αξιοποίησης της τροφής και της μη διέγερσης του ανοσοποιητικού συστήματος.
- 2) Η *μείωση των τοξικών προϊόντων* που παράγονται από την εντερική μικροχλωρίδα, όπως η αμμωνία και οι μεταβολίτες χολικών αλάτων.
- 3) Ο *περιορισμός του ανταγωνισμού* της εντερικής μικροχλωρίδας με τον ξενιστή σε θρεπτικά συστατικά.
- 4) Η *ενίσχυση της πρόσληψης και της χρησιμοποίησης* θρεπτικών συστατικών.

Τέλος, υπάρχει και μία πιο πρόσφατη θεωρία, σύμφωνα με την οποία οι ΑΑΠ δεν δρουν ως αντιβιοτικά, αλλά ως *αντιφλεγμονώδη*, αναστέλλοντας την παραγωγή και την

έκκριση των καταβολικών μεσολαβητών από τα φλεγμονώδη εντερικά κύτταρα (Niewold, 2007).

Ωστόσο, η δράση των ΑΑΠ πιθανόν να περιορίζεται στο γαστρεντερικό σωλήνα, επειδή ορισμένα από τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται ως ΑΑΠ δεν απορροφώνται από τον εντερικό βλεννογόνο. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι η χορήγηση αντιβιοτικών σε αξενικά ζώα δεν είχε αποτέλεσμα, ενώ αντίθετα η χορήγηση βακτηριακών μεταβολιτών προκάλεσε καθυστέρηση στην ανάπτυξη. Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η δράση των ΑΑΠ έχει άμεση σχέση με την εντερική μικροχλωρίδα (Dibner και Richards, 2005).

Οι ΑΑΠ αυξάνουν τις αποδόσεις των ζώων, παρόλο που μειώνουν τον πληθυσμό των λακτοβακίλλων, τα οποία αποτελούν επωφελή βακτήρια για τον ξενιστή (Knarreborg και συν., 2002: Lu και συν., 2008). Αυτό πιθανόν οφείλεται στο γεγονός ότι ταυτόχρονα μειώνουν και τον πληθυσμό του *C. perfringens*, το οποίο προκαλεί διάσπαση των χολικών αλάτων και κακή απορρόφηση των λιπών, με αποτέλεσμα την καθυστέρηση στην ανάπτυξη (Knarreborg και συν., 2002).

Η ευεργετική επίδραση των ΑΑΠ, πιθανόν να οφείλεται και στην αλληλεπίδρασή τους με βακτήρια τα οποία δεν γνωρίζουμε ακόμη, δεδομένου ότι το 90% των βακτηρίων του γαστρεντερικού σωλήνα παρέμεναν άγνωστα (Arajalahti και συν., 2004).

### **2.7.3 Κατάργηση των ΑΑΠ**

Η ενσωμάτωση των ΑΑΠ στα σιτηρέσια των εκτρεφόμενων παραγωγικών ζώων καθορίστηκε από την Οδηγία 70/524 της ΕΕ, με βασική αρχή «να χρησιμοποιούνται ως προσθετικά ζωοτροφών μόνο αυτά που αναφέρονταν στην οδηγία, χωρίς ωστόσο να απαιτείται συνταγή κτηνιάτρου». Η οδηγία αυτή αντικαταστάθηκε από τον Κανονισμό 1831/2003 της ΕΕ, ο οποίος όριζε ότι «αντιβιοτικά, πλην των κοκκιδιοστατικών και των ιστομοναδοστατικών, μπορούν να χρησιμοποιούνται ως προσθετικά ζωοτροφών μόνο έως την 31/1/2005».

Η απαγόρευση των ΑΑΠ είναι το αποτέλεσμα της αντίδρασης των καταναλωτικών οργανώσεων, των πολιτικών πιέσεων και των επιστημονικών ανησυχιών για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε βακτήρια των εκτρεφόμενων παραγωγικών ζώων, τα οποία μέσω της τροφικής αλυσίδας δυνητικά θα μπορούσαν να μεταδοθούν και στον άνθρωπο (Casewell και συν., 2003).

Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας των βακτηρίων στα αντιβιοτικά είναι ένα φαινόμενο τόσο παλιό όσο και τα ίδια τα αντιβιοτικά. Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας έχει στόχο την

προστασία των βακτηρίων που παράγουν τα αντιβιοτικά από τα ίδια τους τα προϊόντα, επιτρέποντάς τους να επιβιώσουν και κυριαρχήσουν (Philips και συν., 2004).

Μία από τις πρώτες αναφορές για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα παραγωγικά ζώα έγινε το 1951, μετά την πειραματική διατροφή ινδορνίθων με streptomycin (Starr και Reynolds, 1951). Την ίδια περίοδο αναφέρθηκε ανάπτυξη ανθεκτικότητας στην tetracycline, όταν χορηγήθηκε ως ΑΑΠ στα κρεοπαραγωγά ορνίθια (Dibner και Richards, 2005).

Το πρώτο βήμα για την αξιολόγηση της ανάπτυξης ανθεκτικότητας από τα βακτήρια των ζώων σε αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται ως ΑΑΠ και τον περιορισμό της χρησιμοποίησης των ΑΑΠ έγινε το 1969 από την επιτροπή SWANN, η οποία καθιέρωσε την κτηνιατρική συνταγή για τη χρησιμοποίησή τους (Dibner και Richards, 2005).

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ) εξέδωσε οδηγίες σχετικά με τη χρησιμοποίηση των ΑΑΠ. Συγκεκριμένα, πρότεινε τη διακοπή της χρησιμοποίησης των ΑΑΠ που ανήκουν στην ίδια κλάση με τα ανθρώπινα αντιβιοτικά, έως τη διεξαγωγή επιδημιολογικών μελετών για την εκτίμηση του κινδύνου. Επίσης, πρότεινε τη διενέργεια επιδημιολογικών μελετών σε επίπεδο κρατών και την εφαρμογή προγραμμάτων ελέγχου για τη χρησιμοποίηση των ΑΑΠ και την ανάπτυξη ανθεκτικότητας από βακτήρια των εκτρεφόμενων παραγωγικών ζώων (World Health Organization, 2004).

Το 1993 υπήρξαν αναφορές για την απομόνωση ανθεκτικών στα γλυκοπεπτίδια εντεροκόκκων από τα παραγωγικά ζώα στην Αγγλία (Bates και συν., 1993). Αυτό ήταν απροσδόκητο, επειδή στα παραγωγικά ζώα δεν χρησιμοποιούνται γλυκοπεπτίδια. Χρησιμοποιείται όμως η avoparcin, η οποία ανήκει σε συγγενική ομάδα (Aarestrup, 2003). Αυτό προκάλεσε τη διενέργεια επιδημιολογικών μελετών για πιθανή συσχέτιση, χωρίς ωστόσο ποτέ να αποδειχθεί. Παρόλα αυτά, η avoparcin απαγορεύτηκε στη Δανία το 1995 και στις υπόλοιπες χώρες της ΕΕ το 1997, λόγω του πιθανού κινδύνου μετάδοσης της ανθεκτικότητας (World Health Organization, 2003). Στη συνέχεια, ακολούθησε η απαγόρευση της virginiamycin από τη Δανία το 1998 και η ΕΕ απαγόρευσε τους υπόλοιπους τέσσερις ΑΑΠ το 1999, στο πλαίσιο της «Προφυλακτικής Αρχής» (Casewall και συν., 2003).

Επίσης, άλλος ένας σημαντικός παράγοντας που συνέβαλε στον περιορισμό της χρησιμοποίησης των ΑΑΠ, κυρίως στις χώρες όπου δεν έχουν απαγορευτεί, όπως οι ΗΠΑ και η Αυστραλία, είναι η πίεση που ασκούν οι καταναλωτικές και μη κυβερνητικές, φιλοζωικές οργανώσεις. Οι οργανώσεις αυτές διεκδικούν καλύτερες συνθήκες εκτροφής και ευζωίας και ελαχιστοποίηση της προληπτικής χρησιμοποίησης φαρμάκων στα εκτρεφόμενα παραγωγικά ζώα. Αποτέλεσμα της πίεσης αυτής ήταν η ανακοίνωση των μεγαλύτερων εταιρειών κατανάλωσης κρέατος των ΗΠΑ, McDonald's και KFC, ότι θα χρησιμοποιούν κρέας και

υποπροϊόντά του μόνο από εκτροφές που δεν χρησιμοποιούν ΑΑΠ ([www.kfc.com/about/facts.htm](http://www.kfc.com/about/facts.htm), [www.mcdonalds.com/corp/values/socialrespons.html](http://www.mcdonalds.com/corp/values/socialrespons.html)).

### **2.7.4 Επιπτώσεις της κατάργησης των ΑΑΠ**

Η απαγόρευση των ΑΑΠ στα σιτηρέσια των κρεοπαραγωγών ορνιθίων είναι ένας σημαντικός παράγοντας, ο οποίος μετέβαλε αναπόφευκτα την εντερική μικροχλωρίδα (Knarreborg και συν., 2002; Dumonceaux και συν., 2006).

Στην πτηνοτροφία, η σημαντικότερη επίπτωση από την απαγόρευση των ΑΑΠ ήταν η αύξηση της συχνότητας εμφάνισης της ΝΕ, η οποία στην υποκλινική της μορφή προκαλεί μείωση των αποδόσεων, ενώ στην οξεία της μορφή χαρακτηρίζεται από υψηλή θνητότητα (Hofshagen και Kaldhusdal, 1992; Kaldhusdal και συν., 2001; Hofacre και συν., 2003). Αυτό αποδεικνύεται και από την αύξηση του επιπολασμού της ΝΕ που παρατηρήθηκε αρχικά στις Σκανδιναβικές χώρες και αργότερα στις υπόλοιπες χώρες τις ΕΕ. Ενδεικτικά, στη Γαλλία ο επιπολασμός της ΝΕ από το 4% το 1995 σχεδόν τριπλασιάστηκε και έφτασε το 12,4% το 1999 (Drouin, 1999). Οι εκτροφείς κρεοπαραγωγών ορνιθίων στην Αμερική, οι οποίοι σταμάτησαν εθελοντικά τη χρησιμοποίηση ΑΑΠ, παρατήρησαν αύξηση στη συχνότητα εμφάνισης των κλωστριδιακών λοιμώξεων, όπως της ΝΕ, της χολαγγειοηπατίτιδας, της γαγγραινώδους δερματίτιδας και της αλλαντίασης (Shane, 2004).

Όπως προαναφέρθηκε, αντικειμενικά συμπεράσματα για τον επιπολασμό της ΝΕ στο ΗΒ την περίοδο πριν και μετά την κατάργηση των ΑΑΠ δεν υπάρχουν, λόγω απουσίας επιδημιολογικών δεδομένων. Ωστόσο, χρήσιμα συμπεράσματα μπορούν να εξαχθούν από την ποσότητα των αντιβιοτικών που καταναλώθηκαν για τη θεραπεία της ΝΕ την περίοδο μετά την απαγόρευση των ΑΑΠ (Veterinary Medicines Directorate, 2000: 2002). Οι πωλήσεις των ΑΑΠ μειώθηκαν κατά 75%, λόγω της απαγόρευσής τους, αλλά οι συνολικές πωλήσεις των αντιμικροβιακών δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά, υποδηλώνοντας ότι η μείωση των πωλήσεων των ΑΑΠ αντισταθμίστηκε από την αύξηση της ποσότητας αντιμικροβιακών για θεραπευτικούς σκοπούς. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη αύξηση στις πωλήσεις των αντικοκκιδιακών φαρμάκων από το 1999 έως το 2002, πιθανόν λόγω της ταυτόχρονης αντιβακτηριακής τους δράσης (Mateos και συν., 2002).

Στη Νορβηγία, η χρησιμοποίηση αντιμικροβιακών φαρμάκων για θεραπευτικούς σκοπούς, στα κρεοπαραγωγά ορνίθια και στα ινδορνίθια, αυξήθηκε από 22 Kg δραστικών ουσιών ετησίως, τα 5 χρόνια πριν την απαγόρευση, σε 50 Kg ετησίως, τα επόμενα 6 χρόνια από την απαγόρευση. Αυτό ισοδυναμεί με κάτι παραπάνω από διπλασιασμό της ποσότητας των χρησιμοποιούμενων αντιμικροβιακών ουσιών, υποδηλώνοντας την ταυτόχρονη αύξηση

της συχνότητας εμφάνισης βακτηριακών νοσημάτων και ιδιαίτερα της NE (Grave και συν., 2004).

Εναλλακτικά, στις χώρες όπου δεν υπήρξε αύξηση της ποσότητας των χρησιμοποιούμενων αντιμικροβιακών φαρμάκων, υπήρξε αντικατάσταση των αντικοκκιδιακών φαρμάκων που ήταν μερικώς αποτελεσματικά κατά του *C. perfringens*, όπως η lasalocid, η monensin και η salinomycin, με εκείνα που ήταν πλήρως αποτελεσματικά, όπως η narasine (Grave και συν., 2004).

Η προληπτική χορήγηση αντικοκκιδιακών φαρμάκων στα σιτηρέσια των κρεοπαραγωγών ορνιθίων αμφισβητείται και η πιθανή αύξηση του χρόνου αναμονής τους θα κάνει τα κρεοπαραγωγά ορνίθια ακόμη πιο ευπαθή στη NE (Elwinger και συν., 1992α, β). Επιπλέον, το ενδεχόμενο απαγόρευσης της προληπτικής χορήγησης αντικοκκιδιακών φαρμάκων στα σιτηρέσια των κρεοπαραγωγών ορνιθίων, το 2012, γίνεται ολοένα και πιο ρεαλιστικό, με άμεση επίπτωση στον έλεγχο της NE (McCartney, 2002: Immerseel και συν., 2004: Shirley και συν., 2007).

Η εφαρμογή καταλλήλων διαχειριστικών πρακτικών και αυστηρών μέτρων βιοασφάλειας, σύμφωνα με το πρότυπο της Σουηδίας, μπορεί να αναπληρώσει την απαγόρευση της προληπτικής χορήγησης αντιβιοτικών φαρμάκων στα σιτηρέσια των κρεοπαραγωγών ορνιθίων (Inborg, 2001).

Η χρησιμοποίηση των ΑΑΠ, στη Σουηδία, απαγορεύτηκε το 1998 και η συνολική ποσότητα αντιβιοτικών μειώθηκε από 2000 Kg το 1997 σε 100 Kg το 1998, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν κυρίως για τη θεραπεία της NE (Inborg, 2001). Η απαγόρευση της χρησιμοποίησης των ΑΑΠ οδήγησε σε αύξηση του ποσοστού απόρριψης σφαγίων ορνιθίων στα πτηνοσφαγεία, λόγω χολλαγγειοηπατίτιδας από *C. perfringens*. Παρόλα αυτά, από το 1998, το ποσοστό απόρριψης και η ποσότητα των αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν θεραπευτικά επανήλθαν στα επίπεδα που βρίσκονταν πριν την απαγόρευση (Inborg, 2001).

Η Σουηδική εμπειρία απέδειξε ότι με την εφαρμογή αυστηρών μέτρων βιοασφάλειας, αποτελεσματικών πρακτικών διαχείρισης και την κατάλληλη σύνθεση του σιτηρεσίου, η χρησιμοποίηση αντιμικροβιακών φαρμάκων στα εκτρεφόμενα παραγωγικά ζώα μπορεί να μειωθεί κατά 55% σε διάστημα 13 ετών. Επίσης, μειώθηκε σημαντικά ο ρυθμός ανάπτυξης ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά από τους βακτηριακούς πληθυσμούς (Wierup, 2001).

Ωστόσο, η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Υγεία των Ζώων (ήδη ο Διεθνής Οργανισμός για την Υγεία των Ζώων) ανέφερε ότι η απαγόρευση των ΑΑΠ στα σιτηρέσια των παραγωγικών ζώων στην ΕΕ είχε ως αποτέλεσμα την υποβάθμιση των συνθηκών ευζωίας των παραγωγικών ζώων και την αύξηση της θνητότητας, της χορηγούμενης ποσότητας των

θεραπευτικών φαρμακευτικών ουσιών και της συχνότητας εμφάνισης των τροφογενών δηλητηριάσεων στους ανθρώπους (Casewell και συν., 2003).

### **2.7.5 Αντικλωστριδιακή δράση των ΑΑΠ και των αντικοκκιδιακών φαρμάκων**

Μετά την απαγόρευση της avoparcin, της ardamycin, της bacitracin, της virginiamycin, της tylosin και της spiramycin, παρέμειναν μόνο 4 δραστικές ουσίες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προσθετικά ζωοτροφών στην ΕΕ, τουλάχιστον ως το 2012, οπότε θα γίνει και η επαναξιολόγησή τους. Αυτές είναι η salinomycin, η monensin, η avilamycin και η flavophospholipol, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως ΑΑΠ (Cervantes, 2004).

Τα τέσσερα αντιβιοτικά που επιτρέπεται ακόμη να χρησιμοποιηθούν ως ΑΑΠ στα σιτηρέσια των κρεοπαραγωγών ορνιθίων εκδηλώνουν αντικλωστριδιακή δράση, με εξαίρεση την flavophospholipol. Συγκεκριμένα, η salinomycin μείωσε τον πληθυσμό του *C. perfringens* στο γαστρεντερικό σωλήνα και τη σοβαρότητα των αλλοιώσεων ΝΕ μετά την πειραματική μόλυνση (Engberg και συν., 2000: Jackson και συν., 2003).

Επιπλέον, η salinomycin και η monensin, λόγω της αντικοκκιδιακής τους δράσης, περιορίζουν τον τραυματισμό του γαστρεντερικού σωλήνα που οφείλεται στα κοκκίδια, αποτρέποντας τη δράση του σημαντικότερου προδιαθεσικού παράγοντα της ΝΕ (McDougald και συν., 1996).

Τα ιονοφόρα αντικοκκιδιακά, όπως η narasine και η manduramycin, έχουν in vivo και αντικλωστριδιακή δράση στο γαστρεντερικό σωλήνα των κρεοπαραγωγών ορνιθίων (Elwinger και συν., 1998). Συγκεκριμένα, η monensin και η narasine περιόρισαν τη θνητότητα που οφειλόταν στη ΝΕ πάνω από 20%, σε πτηνά που μολύνθηκαν ενδοδωδεκαδακτυλικά με *C. perfringens* (Vissienon και συν., 2000).

Η avilamycin έχει ισχυρή αντικλωστριδιακή δράση in vitro και in vivo (Devriese και συν., 1993: Watkins και συν., 1997). Συγκεκριμένα, μετά την ενδοδωδεκαδακτυλική μόλυνση των κρεοπαραγωγών ορνιθίων με *C. perfringens* παρατηρήθηκε μείωση του πληθυσμού του *C. perfringens* στο γαστρεντερικό σωλήνα και της θνητότητας που οφειλόταν στη ΝΕ (Elwinger και συν., 1998: Vissienon και συν., 2000).

Οι αναφορές για τη δράση της flavophospholipol κατά του *C. perfringens* είναι περιορισμένες. Σε μία μελέτη παρατηρήθηκε μείωση του πληθυσμού του *C. perfringens* στα κόπρανα των κρεοπαραγωγών ορνιθίων στην ηλικία κατά τη σφαγή με την προσθήκη flavophospholipol (Bolder και συν., 1999). Στις περισσότερες επιδημιολογικές μελέτες, το

*C. perfringens* φαίνεται να είναι ανθεκτικό στη flavophospholipol (Devriese και συν., 1993: Martel και συν., 2004).

## **2.8 Προδιαθεσικοί παράγοντες**

Η NE χαρακτηρίζεται ως πολυπαραγοντικό νόσημα ή σύνδρομο, διότι παρόλο που το *C. perfringens* είναι ο αιτιολογικός της παράγοντας δεν είναι *per se* ικανός να οδηγήσει στην εκδήλωση του νοσήματος. Απαιτείται η ταυτόχρονη δράση προδιαθεσικών παραγόντων, οι οποίοι διαμορφώνουν κατάλληλα τις συνθήκες στο γαστρεντερικό σωλήνα, έτσι ώστε να ευνοείται ο πολλαπλασιασμός και η παραγωγή τοξινών από το *C. perfringens* (Shane και συν., 1984). Επίσης, δεν είναι όλα τα στελέχη *C. perfringens* ικανά να προκαλέσουν νόσημα, παρά μόνο εκείνα που φέρουν τα απαραίτητα γονίδια (Timbermont και συν., 2008). Οι σημαντικότεροι προδιαθεσικοί παράγοντες για την εκδήλωση της NE στα κρεοπαραγωγά ορνίθια είναι (Williams, 2005: McDevitt και συν., 2006):

- Ο τραυματισμός του γαστρεντερικού βλεννογόνου από μολυσματικούς ή μηχανικούς παράγοντες.
- Η υψηλή περιεκτικότητα του σιτηρεσίου σε ΜΣΠ, ψευδάργυρο, πρωτεΐνες και έλαια ζωικής προέλευσης.
- Η ύπαρξη επιβλαβών ουσιών στο σιτηρέσιο.
- Τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του σιτηρεσίου.
- Οι διαχειριστικοί, οι περιβαλλοντικοί και οι λοιμώδεις παράγοντες.

### **2.8.1 Τραυματισμός του γαστρεντερικού βλεννογόνου**

Ο πιο σημαντικός προδιαθεσικός παράγοντας της NE είναι ο τραυματισμός του γαστρεντερικού βλεννογόνου και η διάσπαση του εντερικού βλεννογόνιου φραγμού, λόγω της προσβολής από κοκκίδια (Al-Sheikly και Al-Saieg, 1980). Συγκεκριμένα, τα είδη κοκκιδίων που προσβάλλουν το λεπτό έντερο, όπως η *E. maxima* και η *E. acervulina*, είναι γνωστό ότι προδιαθέτουν στην εκδήλωση της NE (Al-Sheikly και Al-Saieg, 1980: Hofacre και συν., 1998: Jackson και συν., 2003). Ορνίθια τα οποία έχουν μολυνθεί με *E. brunneti* ή *E. necatrix*, έχουν υψηλότερο πληθυσμό *C. perfringens* στο γαστρεντερικό σωλήνα, συγκριτικά με ορνίθια που είναι απαλλαγμένα από κοκκίδια (Baba και συν., 1992: 1997).

Σε συνθήκες εκτροφής, η διενέργεια παρασιτολογικών εξετάσεων αποκαλύπτει συχνά σε περιστατικά NE την ταυτόχρονη παρουσία ωοκύστεων *Eimeria* spp. (Helmboldt και Bryant, 1971: Long και συν., 1974: Broussard και συν., 1986). Σύμφωνα με τους Long και συν. (1974), το 75% των πτηνών τα οποία εκδήλωσαν NE ήταν μολυσμένα και με κοκκίδια.



Η NE δεν παρατηρείται συχνά σε όρνιθες που εκτρέφονται σε κλωβοστοιχίες, εκτός εάν προηγουμένως ή ταυτόχρονα έχουν μολυνθεί με κοκκίδια (Frame και Bickford, 1986: Dhillon και συν., 2004).

Η ασκαριδίωση των ινδορνίθων επηρεάζει επίσης την εκδήλωση της NE. Συγκεκριμένα, η ταυτόχρονη ή η προηγούμενη μόλυνση των πτηνών με ασκαρίδες επιδεινώνει την εκδήλωση της NE (Norton και συν., 1992: Droual και συν., 1995). Ο μηχανισμός με τον οποίο οι ασκαρίδες επηρεάζουν την εκδήλωση της NE στις ινδορνίθες είναι ανάλογος με το μηχανισμό δράσης των κοκκιδίων στα ορνίθια (Norton και συν., 1992).

Τα φυσικά χαρακτηριστικά της στρωμνής επηρεάζουν τη συχνότητα εμφάνισης της NE (Branton και συν., 1997). Λόγω της έμφυτης συνήθειας των ορνιθίων να σκαλίζουν το έδαφος και τη στρωμνή και να καταναλώνουν τεμάχια αυτής, μπορεί να προκληθεί τραυματισμός του εντερικού βλεννογόνου, φλεγμονή, ακόμη και αιμορραγία, διαμορφώνοντας το κατάλληλο περιβάλλον στο γαστρεντερικό σωλήνα για τον πολλαπλασιασμό του *C. perfringens*. Αξίζει, επίσης, να αναφερθεί ότι η κακή ποιότητα των υλικών από τα οποία αποτελείται η στρωμνή, καθώς και οι κακές συνθήκες εκτροφής μπορεί να επηρεάσουν τα ποιοτικά της χαρακτηριστικά, όπως την υγρασία, τη θερμοκρασία, το pH και τη συγκέντρωση αμμωνίας, με αποτέλεσμα να ευνοείται ο πολλαπλασιασμός των βακτηρίων και των κοκκιδίων (Lovanh και συν., 2007).

### **2.8.2 Σιτηρέσια υψηλής περιεκτικότητας σε ΜΣΠ**

Μεταξύ της σύνθεσης του σιτηρεσίου και της εκδήλωσης της NE υπάρχει ισχυρός συσχετισμός (McDevitt και συν., 2006). Συγκεκριμένα, τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του αμύλου και των άλλων υδατανθράκων, καθώς επίσης και η παρουσία μυκήτων και δευτερογενών μεταβολιτών τους, προδιαθέτουν στην εκδήλωση της NE (Bach-Knudsen, 1997: D'Mello, 1997: Acamovic και συν., 2004: Hetland και συν., 2004: Tester και Karkalas, 2004: Fink-Gremmels, 2005).

Τα σιτηρέσια, τα οποία έχουν ως βασική πηγή δημητριακών καρπών το σιτάρι, το κριθάρι, τη σίκαλη, τη βρώμη ή το λιναρόσπορο, είναι πλούσια σε ΜΣΠ (Branton και συν., 1987: Kaldhusdal και Hofshagen, 1992: Riddell και Kong, 1992: Kocher, 2003: Alzueta και συν., 2003). Τα σιτηρέσια αυτά ευνοούν τον πολλαπλασιασμό του *C. perfringens* και αυξάνουν τον κίνδυνο εκδήλωσης NE, συγκριτικά με τα σιτηρέσια που έχουν βάση τον αραβόσιτο (Branton και συν., 1987: Kaldhusdal και Hofshagen, 1992: Riddell και Kong, 1992: Klasing, 1998: Choct και συν., 1999). Ειδικότερα, έχει υπολογιστεί ένας δείκτης, ανάλογα με την ποσότητα σιταριού και κριθαριού προς την ποσότητα αραβοσίτου στο

σιτηρέσιο, ο οποίος αποτελεί χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο για την εκτίμηση της πιθανότητας εκδήλωσης της NE (Kaldhusdal και Skjerve, 1996).

Σε in vitro πείραμα, παρατηρήθηκε ότι ο πληθυσμός του *C. perfringens* αυξήθηκε με την προσθήκη πεπτού σιταριού και κριθαριού, ενώ αντίθετα μειώθηκε με την προσθήκη πεπτού αραβόσιτου (Annett και συν., 2002). Ο πολλαπλασιασμός του *C. perfringens* πιθανόν να ευνοείται από συστατικά που περιέχονται στο σιτάρι και το κριθάρι ή αντίθετα να αναστέλλεται από συστατικά που υπάρχουν στον αραβόσιτο (Immerseel και συν., 2004).

Οι ΜΣΠ αποτελούν ετερογενή ομάδα πολυσακχαριτών, οι οποίοι ποικίλουν στο βαθμό υδατοδιαλυτότητας, το μέγεθος και τη δομή τους. Λόγω της ιδιαίτερης δομής τους και ειδικότερα λόγω της ύπαρξης των  $\beta_{1-3}$  και  $\beta_{1-6}$  γλυκοσιδικών δεσμών, δεν μπορούν να διασπαστούν από τα ένζυμα του πεπτικού συστήματος των πτηνών (Iji και Tivey, 1998: Juskiewicz και συν., 2004). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, η υψηλή περιεκτικότητα του σιτηρεσίου σε ΜΣΠ να προκαλεί μεταβολές στο περιβάλλον του γαστρεντερικού σωλήνα και να διαταράσσει την αρμονική ισορροπία της εντερικής μικροχλωρίδας. Επίσης, τα συστατικά αυτά μπορούν να αποτελέσουν ευνοϊκό υπόστρωμα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών της εντερικής μικροχλωρίδας και ιδιαίτερα για τους επιβλαβείς βακτηριακούς πληθυσμούς (Choct και συν., 1996: Iji και Tivey, 1998: Arajalahti και συν., 2004).

Οι ΜΣΠ είναι υδρόφιλοι, προκαλώντας αύξηση της συγκέντρωσης νερού στον αυλό του γαστρεντερικού σωλήνα. Η αύξηση της περιεκτικότητας του εντερικού περιεχομένου σε νερό, ευνοεί τον πολλαπλασιασμό των παθογόνων βακτηρίων (Bedford και Arajalahti, 2000: Gilbert και Slavik, 2004). Επιπλέον, η αύξηση της συγκέντρωσης νερού στο γαστρεντερικό σωλήνα προκαλεί, αντισταθμιστικά, αύξηση της κατανάλωσης νερού για τη διατήρηση της ομοιοστασίας. Ωστόσο, η αυξημένη κατανάλωση νερού προκαλεί αύξηση της ποσότητας νερού που αποβάλλεται με τα κόπρανα, με αποτέλεσμα την ύγρανση της στρωμνής και την αύξηση του βακτηριακού της φορτίου και ιδιαίτερα των παθογόνων βακτηρίων. Η αύξηση του βακτηριακού της φορτίου μπορεί να αποτελέσει αφορμή για την εκδήλωση εντερίτιδας ή συνηθέστερα να την επιδεινώσει (McDevitt και συν., 2006).

Ταυτόχρονα, οι ΜΣΠ προκαλούν αύξηση του ιξώδους (Acamovic, 2001: Choct, 2001, Horwood και συν., 2004) και του χρόνου διαβατότητας του εντερικού περιεχομένου (Gohl και Gohl, 1977: Jia και συν., 2009). Η αύξηση του ιξώδους μειώνει την πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών (Langhout και συν., 2000: Choct, 2001: Horwood και συν., 2004). Συγκεκριμένα, η αύξηση του ιξώδους του εντερικού περιεχομένου λειτουργεί ως μηχανικός φραγμός ανάμεσα στα ένζυμα του πεπτικού συστήματος και τα συστατικά του σιτηρεσίου, με αποτέλεσμα την ατελή διάσπασή τους και την περιορισμένη απορρόφησή τους από τον

εντερικό βλεννογόνο. Η αύξηση της διαθεσιμότητας των θρεπτικών συστατικών στο οπίσθιο τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα, λόγω της ατελούς διάσπασης, ευνοεί τον πολλαπλασιασμό των υποχρεωτικά αναερόβιων βακτηρίων και των εντεροβακτηρίων, δημιουργώντας τις κατάλληλες συνθήκες για την ανάπτυξη του *C. perfringens* (Vahjen και συν., 1998).

Ορισμένοι ΜΣΠ αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες και γλυκοπρωτεΐνες του εντερικού επιθηλίου, προκαλώντας διαταραχή της λειτουργίας του εντέρου και αύξηση της έκκρισης βλέννης. Αυτό δίνει τη δυνατότητα στα δυνητικά παθογόνα βακτήρια να προσκολληθούν στη βλέννη ή το βλεννογόνο και να πολλαπλασιαστούν (Kleessen και συν., 2003: Piel και συν., 2005). Ορισμένα βλεννολυτικά βακτήρια, όπως το *C. perfringens*, μπορούν να χρησιμοποιήσουν τη βλέννη ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό τους (De Plancke και συν., 2002: Collier και συν., 2003).

Σε ορισμένες περιπτώσεις, τόσο οι ΜΣΠ όσο και οι ολιγοσακχαρίτες αλληλεπιδρούν με τα βακτήρια της εντερικής μικροχλωρίδας, εμποδίζοντας την εγκατάστασή τους στο γαστρεντερικό σωλήνα (Kleessen και συν., 2003: Lan και συν., 2005: Roberfroid, 2005). Επιπλέον, η παρουσία των ΜΣΠ διεγείρει τον πολλαπλασιασμό του *C. perfringens* και ταυτόχρονα περιορίζει την ανάπτυξη βακτηρίων της εντερικής μικροχλωρίδας που το ανταγωνίζονται, όπως οι λακτοβάκιλλοι (Choct και συν., 1996: Annett και συν., 2002).

Οι ΜΣΠ επηρεάζουν και έμμεσα την εκδήλωση ΝΕ, λόγω της επίδρασης που ασκούν στην εκδήλωση της κοκκιδίωσης. Ο Williams (1992) απέδειξε ότι η παθογόνος δράση της *E. tenella* ήταν ηπιότερη σε ορνίθια που διατρέφονταν με αραβόσιτο, συγκριτικά με ορνίθια που διατρέφονταν με σιτάρι. Αυτό πιθανόν οφείλεται στα υψηλότερα επίπεδα βιταμινών Α και Ε στο σιτηρέσιο αραβόσιτου, οι οποίες εκδηλώνουν επιθηλιοπροστατευτική και ανοσοενισχυτική δράση, καθώς επίσης και στις υψηλότερες συγκεντρώσεις νιασίνης και ριβοφλαβίνης στα σιτηρέσια σιταριού, οι οποίες ενισχύουν την παθογόνο δράση της *E. tenella* (Williams, 2005).

Ο λιναρόσπορος περιέχει μεγάλη ποσότητα ΜΣΠ, γεγονός που προκαλεί αύξηση του ιξώδους του εντερικού περιεχομένου. Συγκεκριμένα, η προσθήκη 160 g λιναρόσπορου ανά Kg σιτηρεσίου προκαλεί αύξηση του ιξώδους του περιεχομένου του ειλεού κατά 70 φορές, συγκριτικά με τα πτηνά των οποίων το σιτηρέσιο περιέχει αραβόσιτο (Alzueta και συν., 2003). Το περιεχόμενο γίνεται σχεδόν κολλώδες και η διέλευση κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα καθυστερεί. Επιπλέον, εκτός από τους ΜΣΠ, ο λιναρόσπορος περιέχει και επιβλαβείς ουσίες, όπως η λινατίνη, οι κυανογλυκοζίτες, οι αναστολείς θρυψίνης και το φυτικό οξύ (Madhusudhan και συν., 1986: Bhatta, 1995). Τέλος, παρά το γεγονός ότι η

προσθήκη λιναρόσπορου προκαλεί αύξηση του αριθμού των λακτοβακίλλων, τα οποία αποτελούν επωφελή βακτήρια της εντερικής μικροχλωρίδας, ταυτόχρονα προκαλεί αύξηση των εντεροβακτηριακών και των εντερόκοκκων, τα οποία έχουν ενοχοποιηθεί ως αίτια καθυστέρησης της ανάπτυξης στα κρεοπαραγωγά ορνίθια (Knaarreborg και συν., 2002).

### **2.8.3 Σιτηρέσια υψηλής περιεκτικότητας πρωτεϊνών ζωικής προέλευσης**

Τα υπιπρωτεϊνικά σιτηρέσια και ιδιαίτερα εκείνα των οποίων οι πρωτεΐνες είναι κατά βάση ζωικής προέλευσης, προδιαθέτουν στην εκδήλωση της NE στα κρεοπαραγωγά ορνίθια (Kaldhusdal, 2000: Kocher, 2003: Drew και συν., 2004: Wilkie και συν., 2005).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της εικοσαετούς επιδημιολογικής μελέτης των Kaldhusdal και Skjerve (1996) στη Νορβηγία, υπάρχει θετική συσχέτιση της περιεκτικότητας του σιτηρεσίου σε ιχθυάλευρο και της συχνότητας εμφάνισης της NE. Ενδεικτικό της προδιάθεσης των ζωικών πρωτεϊνών και ιδιαίτερα του ιχθυαλεύρου, στην εκδήλωση της NE, είναι η προσθήκη του στα σιτηρέσια των ορνιθίων στα περισσότερα πειραματικά μοντέλα αναπαραγωγής του νοσήματος (Truscott και Al-Sheikhly, 1977: Prescott 1979: Cowen και συν., 1987: Gholamiandekhordi και συν., 2007).

Η πηγή προέλευσης των πρωτεϊνών του σιτηρεσίου επηρεάζει σημαντικά τον πληθυσμό του *C. perfringens* στο γαστρεντερικό σωλήνα. Σε σχετική έρευνα αποδείχθηκε ότι τα πτηνά που είχαν ως πηγή πρωτεϊνών το ιχθυάλευρο παρουσίαζαν σημαντικά υψηλότερο πληθυσμό *C. perfringens* στον ειλέο, συγκριτικά με τα πτηνά που είχαν ως πηγή πρωτεϊνών το σογιάλευρο (Drew και συν., 2004). Επίσης, ο πληθυσμός του *C. perfringens* αυξανόταν με την αύξηση της περιεκτικότητας του σιτηρεσίου σε ιχθυάλευρο, ενώ αντίθετα δεν μεταβαλλόταν με την αύξηση της περιεκτικότητας σε σογιάλευρο. Η ανάλυση και η συγκριτική μελέτη των σιτηρεσίων έδειξε υψηλότερη περιεκτικότητα στα αμινοξέα γλυκίνη και μεθειονίνη στο σιτηρέσιο με βάση το ιχθυάλευρο, συγκριτικά με το σογιάλευρο (Isolatovskaya, 1971: Williams, 2005).

Το *C. perfringens*, όπως προαναφέρθηκε, δεν μπορεί να παράγει 13 από τα 20 απαραίτητα αμινοξέα, με συνέπεια, η ανάπτυξή του στο γαστρεντερικό σωλήνα των πτηνών να εξαρτάται από τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών του σιτηρεσίου (Cooper και Songer, 2009). Η αύξηση της περιεκτικότητας του σιτηρεσίου σε πρωτεΐνες ή σε συγκεκριμένα αμινοξέα πιθανόν αποτελεί το έναυσμα για την υπέρμετρη ανάπτυξη του *C. perfringens* στο γαστρεντερικό σωλήνα των πτηνών, επειδή τόσο η ανάπτυξή του όσο και η παραγωγή της τοξίνης -α επηρεάζεται άμεσα από την παρουσία ορισμένων αμινοξέων (Titball και συν., 1999).

Το αμινοξύ γλυκίνη προάγει την ανάπτυξη του *C. perfringens*, καθώς και την παραγωγή της τοξίνης -α (Ispolatovskaya, 1971: Stevens και Rood, 2000: Wilkie και συν., 2005), ενώ αντίθετα μειώνει τον πληθυσμό των επωφελών βακτηρίων, όπως των λακτοβακίλλων, με αποτέλεσμα την προδιάθεση των πτηνών στην εκδήλωση της NE (Dahiya και συν., 2005). Οι πρωτεΐνες ζωικής προέλευσης έχουν 2-4 φορές υψηλότερη περιεκτικότητα σε γλυκίνη, συγκριτικά με τις πρωτεΐνες φυτικής προέλευσης, ευνοώντας έτσι την υπερανάπτυξη του *C. perfringens* στο γαστρεντερικό σωλήνα. Επίσης, στην προδιάθεση της εκδήλωσης της NE συμβάλλει και το αμινοξύ λυσίνη, ευνοώντας τον πολλαπλασιασμό του *C. perfringens* στον ειλέο και τα τυφλά (Dahiya και συν., 2005).

Σύμφωνα με τους Muhammed και συν. (1975), παρά το γεγονός ότι η μεθειονίνη δεν αποτελεί απαραίτητο αμινοξύ για το *C. perfringens*, διεγείρει έντονα την ανάπτυξή του και είναι απαραίτητη για τη σπορογονία του. Ωστόσο, η δράση της μεθειονίνης στην προδιάθεση για την εκδήλωση NE πλέον αμφισβητείται. Σύμφωνα με τους Wilkie και συν. (2005), η μεθειονίνη όχι απλά δεν ευνοεί τον πολλαπλασιασμό του *C. perfringens*, αλλά αντίθετα προκαλεί μείωσή του. Η αντικλωστριδιακή δράση της μεθειονίνης μπορεί να είναι άμεση στο *C. perfringens* ή έμμεση, λόγω της μεταβολής της σύστασης της εντερικής μικροχλωρίδας (Dahiya, 2007).

Η υψηλή συγκέντρωση πρωτεϊνών στο σιτηρέσιο, η μη ορθή αναλογία των αμινοξέων και η μειωμένη πεπτικότητα τους οδηγεί στην αυξημένη αποβολή τους με τα κόπρανα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της κατανάλωσης νερού, που οδηγεί στην ύγρανση της στρωμνής (McDevitt και συν., 2006). Η αύξηση της υγρασίας της στρωμνής, σε συνδυασμό με την αύξηση της συγκέντρωσης αζώτου, προκαλεί αύξηση του πληθυσμού του *C. perfringens* της στρωμνής και επιδείνωση της κατάστασης (McDevitt και συν., 2006: Lovanh και συν., 2007). Επίσης, μη ισορροπημένα σιτηρέσια μπορούν να προκαλέσουν διατροφικό στρες στα πτηνά. Για παράδειγμα, εάν η αναλογία ενέργειας προς πρωτεΐνη είναι χαμηλή, τότε τα πτηνά καταναλώνουν αντισταθμιστικά μεγαλύτερες ποσότητες τροφής και πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα την αυξημένη συγκέντρωση αζώτου στο εντερικό περιεχόμενο και τα κόπρανα (McDevitt και συν., 2006).

Επιπρόσθετα, τα υψιπρωτεϊνικά σιτηρέσια ή τα σιτηρέσια με μη ορθή αναλογία αμινοξέων, ιδιαίτερα γλυκίνης και ισολευκίνης, έχουν ως συνέπεια την ατελή πέψη και την κακή απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών του σιτηρεσίου από τα πτηνά. Αυτό προκαλεί αύξηση της συγκέντρωσης των θρεπτικών συστατικών και των προϊόντων μεταβολισμού τους στο κατώτερο τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα, όπου χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα από την εντερική μικροχλωρίδα (Williams και συν., 2001: Lan και συν., 2005). Η διάσπαση

των πρωτεϊνών σε αμμωνία και αμίνες ευνοεί τον πολλαπλασιασμό παθογόνων βακτηρίων, όπως το *C. perfringens* (Juskiewicz και συν., 2004). Επιπρόσθετα, η παρουσία αυτών των μεταβολικών προϊόντων έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του pH στο κατώτερο τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα, περιορίζοντας την ανάπτυξη των βακτηρίων της φυσιολογικής εντερικής μικροχλωρίδας και ευνοώντας ακόμη περισσότερο την ανάπτυξη του *C. perfringens* (Juskiewicz και συν., 2004; Lan και συν., 2005).

Είναι πιθανόν, η αύξηση της συχνότητας εμφάνισης της NE να μην οφείλεται *per se* στο ιχθυάλευρο, αλλά να συμβάλλει σε αυτό και η κακή ποιότητα των ιχθυαλεύρων, μέσω της παραγωγής βιογενών αμινών. Οι βιογενείς αμίνες αποτελούν προϊόντα μεταβολισμού των πρωτεϊνών, όταν χρησιμοποιούνται κακής ποιότητας ή μη θερμικά επεξεργασμένο ιχθυάλευρο στο σιτηρέσιο των πτηνών (McDevitt και συν., 2006).

#### **2.8.4 Σιτηρέσια υψηλής περιεκτικότητας σε έλαια ζωικής προέλευσης**

Για να καλυφθούν οι αυξημένες ενεργειακές ανάγκες των κρεοπαραγωγών ορνιθίων, πολύ συχνά, ενσωματώνονται στο σιτηρέσιο έλαια ζωικής ή φυτικής προέλευσης. Η προέλευση των ελαίων επηρεάζει σημαντικά τον πληθυσμό του *C. perfringens*, καθώς και την εκδήλωση της NE. Συγκεκριμένα, η προσθήκη μίγματος ελαίων ζωικής προέλευσης στο σιτηρέσιο κρεοπαραγωγών ορνιθίων προκαλεί αύξηση του πληθυσμού του *C. perfringens*, συγκριτικά με την προσθήκη ελαίου φυτικής προέλευσης, όπως το σογιέλαιο (Knarreborg και συν., 2002). Αυτό πιθανόν οφείλεται στην επίδραση που ασκούν τα ζωικά έλαια στην εντερική μικροχλωρίδα, λόγω της μεταβολής του ιζώδους και του χρόνου διαβατότητας του εντερικού περιεχομένου (Danicke και συν., 1999).

#### **2.8.5 Σιτηρέσια υψηλής περιεκτικότητας σε ψευδάργυρο**

Η συμμετοχή του ψευδαργύρου στην προδιάθεση της NE οφείλεται στην επίδραση που ασκεί ο ψευδάργυρος στην τοξίνη -α. Συγκεκριμένα, η προσθήκη ψευδαργύρου στα σιτηρέσια των κρεοπαραγωγών ορνιθίων προκαλεί αύξηση της παραγωγής τοξίνης -α και της συχνότητας εμφάνισης της NE (Baba και συν., 1992). Επιπλέον, ο ψευδάργυρος προστατεύει την τοξίνη -α από τη λυτική δράση της θρυψίνης (Baba και συν., 1992) και των πρωτεασών (Sato και συν., 1977). Τέλος, ενδεικτικό είναι το γεγονός ότι παρατηρούνται σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις ψευδαργύρου στο σιτάρι, τα κρεατάλευρα και τα ιχθυάλευρα, τα οποία προδιαθέτουν στην εκδήλωση της NE (Williams, 2005).

### **2.8.6 Επιβλαβείς ουσίες του σιτηρεσίου**

Τα προϊόντα φυτικής προέλευσης και ειδικότερα οι δημητριακοί καρποί αποτελούν τη βάση της διατροφής των εκτρεφόμενων παραγωγικών ζώων. Ωστόσο, η φύση παρέχει την ικανότητα στα φυτά να συνθέτουν μοναδικές χημικές ουσίες, οι οποίες χρησιμοποιούνται ως αμυντικοί μηχανισμοί, αποτρέποντας τη συγκομιδή και την κατανάλωσή των φυτών. Οι επιβλαβείς αυτές ουσίες περιλαμβάνουν τους αναστολείς ενζύμων, τα αλκαλοειδή, τις σαπωνίνες, τους γλυκοζίτες, τους ολιγοσακχαρίτες, τους ΜΣΠ κ.ά. (McDevitt και συν., 2006).

Οι δημητριακοί καρποί συχνά περιέχουν αναστολείς αμυλάσης, οι οποίοι περιορίζουν τη διάσπαση του αμύλου από τα ένζυμα του πεπτικού συστήματος και την απορρόφησή του από το γαστρεντερικό βλεννογόνο (Carre, 2004). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, το άμυλο να προωθείται προς το κατώτερο τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα, όπου διασπάται από τα ένζυμα πέψης των βακτηρίων και αξιοποιείται από αυτά, προκαλώντας μεταβολές στο περιβάλλον του γαστρεντερικού σωλήνα (Reid και Hillman, 1999: Haralampu, 2000: Weurding και συν., 2001: Svihus και συν., 2005).

Οι λεκτίνες της σόγιας και του σιταριού είναι γλυκοπρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους. Αλληλεπιδρούν με το εντερικό επιθήλιο, προκαλώντας βλάβες στο βλεννογόνο, διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος και μεταβολές στη σύσταση της εντερικής μικροχλωρίδας (Pusztai και Bardocz, 1996: Kleessen και συν., 2003: Lan και συν., 2005). Επίσης, αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες και γλυκοπρωτεΐνες της επιφάνειας του εντερικού βλεννογόνου, μεταβάλλοντας την ικανότητα προσκόλλησης των βακτηρίων στο εντερικό επιθήλιο και το ρυθμό του πολλαπλασιασμού τους (Calderon και συν., 1997).

Οι αναστολείς πρωτεάσης, οι οποίοι απαντώνται σε ποικίλες συγκεντρώσεις στο σιτάρι και στα θερμικά επεξεργασμένα σογιάλευρα, μειώνουν την πεπτικότητα των πρωτεϊνών (Clarke και Wiseman, 2005). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης αζώτου στο κατώτερο τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα, ευνοώντας τον πολλαπλασιασμό του *C. perfringens*. Η επίδραση των αναστολέων πρωτεάσης στις αποδόσεις και γενικότερα στην υγεία των ορνιθίων είναι ιδιαίτερη σημαντική, επειδή το σιτάρι και το σογιάλευρο είναι από τα σημαντικότερα συστατικά των σιτηρεσίων των κρεοπαραγωγών ορνιθίων στις χώρες της Β. Ευρώπης (McDevitt και συν., 2006).

Ουσίες όπως τα αλκαλοειδή, τα τερπένια, οι μυκοτοξίνες και οι κυανογλυκοζίτες αλληλεπιδρούν με τα βακτήρια της εντερικής μικροχλωρίδας και επηρεάζουν τη σύνθεσή της. Επίσης, τα συστατικά αυτά αλληλεπιδρούν με άλλα συστατικά του σιτηρεσίου, καθώς και με τα κύτταρα του γαστρεντερικού σωλήνα και άλλων ιστών, μεταβάλλοντας τις ανάγκες των

πτηνών σε θρεπτικά συστατικά (Danicke, 2002: Viera, 2003: Acamovic και συν., 2004: Acamovic και Brooker, 2005: Brooker και Acamovic, 2005). Συγκεκριμένα, οι μυκοτοξίνες, λόγω της οξειδωτικής τους δράσης, μειώνουν τη συγκέντρωση ουσιών του σιτηρεσίου με αντιοξειδωτικές ιδιότητες, όπως η βιταμίνη Ε και το σελήνιο (Se), ενώ ταυτόχρονα αυξάνουν τις ανάγκες του οργανισμού σε αυτές τις ουσίες (Fink-Gremmels, 2005). Για αυτόν το λόγο, τα πτηνά τα οποία υφίστανται διατροφικό στρες γίνονται πιο ευπαθή σε παθογόνα βακτήρια, όπως είναι το *C. perfringens* (McDevitt και συν., 2006).

### **2.8.7 Ποιοτικά χαρακτηριστικά του σιτηρεσίου**

Τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του σιτηρεσίου μπορούν να επηρεάσουν τον πληθυσμό του *C. perfringens* στο γαστρεντερικό σωλήνα και να προδιαθέσουν την εκδήλωση της ΝΕ (Branton και συν., 1987: Svihus και συν., 2004: McDevitt και συν., 2005).

Το μέγεθος των σωματιδίων της τροφής και ο βαθμός της πεπτικότητάς της επηρεάζουν την ακεραιότητα και την υγεία του γαστρεντερικού σωλήνα, καθώς επίσης την ποιοτική και ποσοτική σύσταση των πληθυσμών της εντερικής μικροχλωρίδας (Svihus και συν., 2004). Συγκεκριμένα, το μέγεθος των σωματιδίων της τροφής μειώνει τη συχνότητα εμφάνισης της ΝΕ. Αυτό πιθανόν οφείλεται στο γεγονός ότι λόγω του μικρού μεγέθους των σωματιδίων, η τροφή κινείται ταχύτερα στο γαστρεντερικό σωλήνα και περιορίζει τη δυνατότητα προσκόλλησης του *C. perfringens* στα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου (McDevitt και συν., 2005).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης των Engberg και συν. (2002), ο τρόπος αλέσματος του σιτηρεσίου δεν επηρεάζει τον πληθυσμό του *C. perfringens* στο γαστρεντερικό σωλήνα των πτηνών. Αντίθετα, σύμφωνα με τους Branton και συν. (1987), η θνητότητα, εξαιτίας της ΝΕ, είναι μεγαλύτερη σε ορνίθια που κατανάλωσαν τροφή σε μορφή τριμμάτων, η οποία είχε αλεστεί σε σφυρόμυλο, συγκριτικά με ορνίθια που κατανάλωσαν τροφή που είχε αλεστεί σε κυλινδρόμυλο. Η μορφή με την οποία χορηγείται το σιτηρέσιο επηρεάζει τη σύσταση της εντερικής μικροχλωρίδας. Συγκεκριμένα, η κατανάλωση σιτηρεσίου σε αλευρώδη μορφή προκαλεί μείωση του πληθυσμού των εντεροβακτηρίων και αύξηση του πληθυσμού του *C. perfringens* και των λακτοβακίλλων, στο γαστρεντερικό σωλήνα των πτηνών, συγκριτικά με την κατανάλωση σιτηρεσίου σε μορφή συμπύκτων (Engberg και συν., 2002).

Τα αποτελέσματα της έρευνας για την επίδραση της προσθήκης ολόκληρων καρπών σιταριού στην προδιάθεση της εκδήλωσης της ΝΕ είναι αντικρουόμενα. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τον Petersen (1997), στη Δανία μετά την προσθήκη ολόκληρων καρπών



σιταριού στα σιτηρέσια των κρεοπαραγωγών ορνιθίων παρατηρήθηκε αύξηση του επιπολασμού της NE και της κοκκιδίωσης, χωρίς ωστόσο να διευκρινιστεί ο μηχανισμός. Επίσης, η προσθήκη ολόκληρων καρπών σιταριού εμφανίζει θετική συσχέτιση με τη χρησιμοποίηση αντιβιοτικών για τη θεραπεία της NE (Hughes και συν., 2008). Αντίθετα, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης των Engberg και συν. (2004), η προσθήκη ολόκληρων καρπών σιταριού μειώνει τον πληθυσμό του *C. perfringens* στο γαστρεντερικό σωλήνα και το pH του αδενώδους στομάχου.

Για την εκδήλωση της NE έχουν επίσης ενοχοποιηθεί σιτηρέσια στα οποία ανευρίσκεται υψηλός πληθυσμός του *C. perfringens* ή των σπόρων αυτού (Frame και Bickford, 1986). Οι σπόροι του *C. perfringens* που απαντώνται στις πρώτες ύλες του σιτηρεσίου ενεργοποιούνται κατά τη θερμική του επεξεργασία, με αποτέλεσμα την προδιάθεση στην εκδήλωση της NE (Morrow, 2001). Επίσης, η θερμική επεξεργασία του σιτηρεσίου αδρανοποιεί κάποια από τα συστατικά του, όπως τα ένζυμα που ενσωματώνονται στο σιτηρέσιο για τη διάσπαση των ΜΣΠ, με αποτέλεσμα την αναστολή της δράσης τους και την προδιάθεση στην εκδήλωση της NE (McDevitt και συν., 2006).

### **2.8.8 Διαχειριστικοί, περιβαλλοντικοί και λοιμώδεις παράγοντες**

Κάθε παράγοντας που προκαλεί καταπόνηση στα ορνίθια θα μπορούσε να μεταβάλλει τις συνθήκες του μικροπεριβάλλοντος του γαστρεντερικού σωλήνα και να προδιαθέσει στην εκδήλωση της NE (McDevitt και συν., 2006).

Οι προγραμματισμένες αλλαγές της σύνθεσης του σιτηρεσίου, όπως η μετάβαση από το σιτηρέσιο έναρξης στο σιτηρέσιο ανάπτυξης, προκαλούν μεταβολές στην εντερική μικροχλωρίδα και διατροφικό στρες, με αποτέλεσμα την προδιάθεση των πτηνών στην εκδήλωση εντερικών νοσημάτων, όπως η NE (Ross Tech, 1999). Αυτό οφείλεται στη διαφορετική σύνθεση του σιτηρεσίου, στη μεταβολή του pH, στην προσθήκη ενζύμων ή στην επίδραση που ασκεί στο ανοσοποιητικό σύστημα (McDevitt και συν., 2006).

Η εντατική γενετική επιλογή που ασκήθηκε στα σύγχρονα κρεοπαραγωγά ορνίθια είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ευαισθησίας των ορνιθίων στην εκδήλωση παθολογικών καταστάσεων του πεπτικού συστήματος. Αυτό αποδίδεται στο γεγονός, ότι η ανάπτυξη των αγγείων του γαστρεντερικού σωλήνα δεν ακολούθησε την υπέρμετρη ανάπτυξη των σκελετικών μυών, με συνέπεια την πλημμελή αιμάτωσή του, την υποξία και τη μειωμένη συγκέντρωση στοιχείων του ανοσοποιητικού συστήματος (Tottori και συν., 1997).

Τα συμπεράσματα από τη μελέτη της διεθνούς βιβλιογραφίας για την επίδραση της θερμοκρασίας στη συχνότητα εκδήλωσης της NE, όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι

αντικρουόμενα, καθώς υπάρχουν αναφορές που υποστηρίζουν ότι εμφανίζεται συχνότερα τους θερμούς μήνες, ενώ αντίθετα άλλη τους ψυχρούς μήνες. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με επιδημιολογική έρευνα που διεξήχθη στη Νορβηγία (Kaldhusdal και Skjerve, 1996), το ποσοστό εμφάνισης της NE ήταν μεγαλύτερο την περίοδο Οκτώβριος – Μάρτιος, ενώ αντίθετα, σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες που διεξήχθησαν στον Καναδά (Long, 1973a: Bernier και συν., 1974), τη Γερμανία (Koehler και συν., 1977) και το ΗΒ (Hermans και Morgan, 2007), η συχνότητα εμφάνισης ήταν μεγαλύτερη τη θερμή περίοδο του έτους (Ιούλιος – Οκτώβριος).

Η αντίθεση των αποτελεσμάτων των παραπάνω επιδημιολογικών μελετών υποδηλώνει ότι η επίδραση της εποχής στη συχνότητα εμφάνισης της NE, επηρεάζεται και από άλλους παράγοντες, πλην της θερμοκρασία, όπως διαχειριστικούς και διατροφικούς. Για παράδειγμα, η σύσταση και η ποιότητα των δημητριακών καρπών εξαρτάται από την εποχή συγκομιδής και τη διάρκεια αποθήκευσής τους (Kaldhusdal και Skjerve, 1996), με αποτέλεσμα να επηρεάζεται και η εντερική μικροχλωρίδα. Επίσης, η χαμηλή θερμοκρασία περιβάλλοντος περιορίζει τη διάρκεια λειτουργίας του συστήματος εξαιρισμού, με αποτέλεσμα την ύγρανση της στρωμνής και την αύξηση του μικροβιακού και του παρασιτικού της φορτίου.

Τέλος, παράγοντες οι οποίοι καταστέλνουν το ανοσοποιητικό σύστημα των ορνιθίων προδιαθέτουν στην εκδήλωση της NE. Συγκεκριμένα, η προσβολή από τον ιό της Λοιμώδους νόσου του Θυλάκου (Infectious Bursal Disease, IBD), τον ιό της Λοιμώδους Αναιμίας των ορνιθίων (Chicken Infectious Anaemia, CIA) και τον ιό της νόσου του Marek (Marek Disease, MD) καταστέλλει τους μηχανισμούς της κυτταρικής και της χυμικής ανοσίας των ορνιθίων, με αποτέλεσμα την προδιάθεση στην εκδήλωση της NE (Schuring και van Gils, 2001: McReynolds και συν., 2004: Williams, 2005).

## **2.9 Συμπτώματα και αλλοιώσεις**

Η NE οφείλεται συχνότερα στο *C. perfringens* τύπου A (Das και συν., 1997: Nauerby και συν., 2003), παρόλο που και ο τύπος C έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την πειραματική αναπαραγωγή του νοσήματος (Shane και συν., 1985). Παρατηρείται κυρίως σε κρεοπαραγωγά ορνίθια ηλικίας από 2 έως 6 εβδομάδων (Long, 1973a). Στις αβγοπαραγωγές όρνιθες, που εκτρέφονται σε κλωβοστοιχίες, παρατηρείται συνήθως σε ηλικία 12-16 εβδομάδων (Frame και Bickford, 1986), ενώ σε αβγοπαραγωγές όρνιθες, που εκτρέφονται σε δάπεδο με στρωμνή, σε ηλικία 3-6 μηνών (Chakraborty και συν., 1984). Στα ινδορνίθια εμφανίζεται συνήθως σε ηλικία 7-12 εβδομάδων (Gazdzinski και Julian, 1992) και σε

ενήλικες ινδόνιθες ταυτόχρονα με την ασκαριδίαση (Norton και συν., 1992) ή την κοκκιδίωση (Droual και συν., 1994).

Το νόσημα εκδηλώνεται με 3 μορφές: την οξεία ή κλασσική, την υποκλινική και τη χολλαγγειοηπατίτιδα.

### **2.9.1 Κλινική**

Χαρακτηριστικό της κλινικής μορφής της NE είναι οι καθημερινοί αιφνίδιοι θάνατοι των πτηνών, αρχικά σε ποσοστό 1% (Helmboldt και Bryant, 1971), ενώ συνολικά η θνητότητα μπορεί να φθάσει έως και το 40%, εάν δεν εφαρμοσθεί θεραπεία (Boullianne, 1999: Ross Tech, 1999). Τα πτηνά, λίγο πριν πεθάνουν, εμφανίζουν αδυναμία μετακίνησης, σύγκλιση των οφθαλμών, πλευρική κατάκλιση και πτώση των πτερύγων και της κεφαλής. Ωστόσο, τις περισσότερες φορές ο θάνατος επέρχεται μέσα σε λίγες ώρες, χωρίς να εκδηλωθούν συμπτώματα (Wages και Opengart, 2003). Συνήθως προσβάλλονται τα πτηνά που βρίσκονται σε καλή θρεπτική κατάσταση και οι αλλοιώσεις σήψης επέρχονται σχετικά γρήγορα. Τα πτηνά που επιβιώνουν εμφανίζουν ανορεξία, κατάπτωση, υπνηλία, ανώμαλο και ανορθωμένο πτέρωμα, διάρροια και αφυδάτωση (Helmboldt και Bryant, 1971: Al-Sheikly και Truscott, 1977α: Al-Sheikly και Al-Saieg, 1980: Gadzinski και Julian, 1992). Η νοσηρότητα και η θνητότητα στην οξεία μορφή της NE κυμαίνονται από 5-10% και 0,5-1%, αντίστοιχα (Shane και συν., 1985).

Οι μακροσκοπικές αλλοιώσεις εντοπίζονται κατά κύριο λόγο στη νήστιδα και τον ειλέο και σπανιότερα στο δωδεκαδάκτυλο και τα τυφλά. Η νήστιδα και ο ειλέος έχουν λεπτά, ευπαθή και διατεταμένα τοιχώματα, λόγω της πλήρωσής τους με αέρια και δύσοσμο καστανόχρωμο περιεχόμενο (Al-Sheikhly και Truscott, 1977α: Fukata και συν., 1988). Η επιφάνεια του βλεννογόνου καλύπτεται αρχικά από καστανόφαιες και στη συνέχεια από κιτρινοπράσινες διφθεροειδείς μεμβράνες ή ψευδομεμβράνες. Ο γαστρεντερικός βλεννογόνος μπορεί να καλύπτεται εξολοκλήρου από μία στοιβάδα ινιδο-νεκρωτικού υλικού, το οποίο αναφέρεται συχνά ως 'τούρκικη πετσέτα-turkish towel' (Porter, 1998). Το δωδεκαδάκτυλο και τα τυφλά συνήθως δεν φέρουν αλλοιώσεις ή σπανιότερα μπορεί να είναι διατεταμένα, πλήρη με αέρια και αιμορραγικό υγρό (Frame και Bickford, 1986).

Οι κυριότερες μακροσκοπικές αλλοιώσεις εντοπίζονται στο έντερο, ωστόσο αλλοιώσεις μπορεί να παρατηρηθούν και στο ήπαρ, τη χοληδόχο κύστη, την καρδιά και τους νεφρούς. Δώδεκα ώρες μετά τη μόλυνση, τα αιμοφόρα αγγεία του ήπατος, του σπλήνα, της καρδιάς και των νεφρών είναι συμφορημένα, ιδιαίτερα στα ετοιμοθάνατα πτηνά (Al-Sheikly και Truscott, 1977α, β). Το ήπαρ εμφανίζει πολυάριθμες εστίες νέκρωσης και

ιστοπαθολογικά φέρει αλλοιώσεις οξείας πηκτικής νέκρωσης, με ήπια φλεγμονώδης αντίδραση και περιορισμένες αιμορραγίες (Ficken και Wages, 1997). Επίσης, συχνά παρατηρούνται αλλαγές στη μορφολογία των ερυθροκυττάρων. Συγκεκριμένα, τα ερυθροκύτταρα γίνονται στρόγγυλα ή ανώμαλα και σε ορισμένες περιπτώσεις λύνονται (Al-Sheikly και Truscott, 1977β). Στα πτηνά που πεθαίνουν αιφνίδια σε νεαρή ηλικία είναι συνήθως υπερμεγέθη πράσινου χρώματος (Eleazer και Harrell, 1976). Ακόμη, παρατηρείται νέκρωση των λεμφοκυττάρων στο θύλακο του Fabricius (Frame και Bickford, 1986: Gazdinski και Julian, 1992).

Η μελέτη της εξέλιξης των μικροσκοπικών αλλοιώσεων της NE, σύμφωνα με τους Al-Sheikly και Truscott (1977α), έδειξε ότι μία ώρα μετά την πειραματική μόλυνση παρατηρείται ήπιο οίδημα και διάταση των αγγείων με μικρή ποσότητα νεκρωμένου επιθηλίου στον αυλό του γαστρεντερικού σωλήνα. Τόσο από την επιφάνεια του βλεννογόνου όσο και από το νεκρωμένο επιθήλιο απομονώνεται μεγάλος αριθμός Gram- θετικών βακίλλων, χωρίς ωστόσο να εισδύουν στα ζωντανά κύτταρα.

Τρεις ώρες μετά τη μόλυνση, ο εντερικός βλεννογόνος εμφανίζεται παχυμένος, φαιού χρώματος. Σε αυτή τη φάση παρατηρείται έντονο οίδημα που οδηγεί στην αποκόλληση της επιθηλιακής στοιβάδας από το χόριο και ιδιαίτερα στην κορυφή των λαχνών. Στον αυλό παρατηρείται αυξημένη ποσότητα νεκρωμένου επιθηλίου και ινιδώδες εξίδρωμα.

Πέντε ώρες μετά τη μόλυνση εμφανίζεται πηκτική νέκρωση της επιθηλιακής στοιβάδας, αλλά και βαθύτερα στο χόριο. Μεταξύ του νεκρωμένου και του υγιούς ιστού σχηματίζεται μία οριοθετημένη ζώνη (demarcation line), όπου αθροίζονται άφθονα μονοπύρρηνα κύτταρα (Long, 1973α: Long και συν., 1974: Al-Sheikhly και Al-Saieg, 1980). Τα αιμοφόρα αγγεία του χορίου ή και του υποβλεννογόνιου χιτώνα εμφανίζουν συμφόρηση ή/και έμφραξη από θρόμβους υαλίνης. Μεγάλες ποσότητες Gram- θετικών βακίλλων αποικίζουν το νεκρωμένο ιστό και οι λάχνες είναι βραχύτερες. Το χόριο είναι διηθημένο από μονοπύρρηνα και ετερόφιλα κύτταρα (Al-Sheikly και Truscott, 1977α).

Οι μικροσκοπικές αλλοιώσεις, οχτώ με δώδεκα ώρες μετά τη μόλυνση, χαρακτηρίζονται από μαζική νέκρωση των λαχνών με νεκρωτικές ζώνες που φτάνουν έως τον υποβλεννογόνιο χιτώνα (Ficken και Wages, 1997) ή ακόμη και έως το μυϊκό χιτώνα (Nairn και Bamford, 1967). Σε αυτό το στάδιο, τα αποπίπτοντα επιθηλιακά κύτταρα, μαζί με τα βακτήρια, τα ερυθροκύτταρα, τα ετερόφιλα κύτταρα, την ινική και το εντερικό περιεχόμενο που υπάρχει, σχηματίζουν στον εντερικό αυλό μία μάζα από ινιδωνεκρωτικό υλικό (Long και συν., 1974: Al-Sheikly και Truscott, 1977β: Shane και συν., 1985).

Η ιστοπαθολογική εικόνα των αλλοιώσεων στα περιστατικά NE που παρατηρούνται σε συνθήκες εκτροφής είναι παρόμοια με την παραπάνω ή ελαφρώς πιο σοβαρή (Helmholtz και Bryant, 1971; Broussard και συν., 1986; Gazdinski και Julian, 1992) και συχνά συνυπάρχουν αλλοιώσεις κοκκιδίωσης (Helmholtz και Bryant, 1971; Long και συν., 1974).

Τα πτηνά που θα επιβιώσουν, εμφανίζουν αναγεννητικές αλλαγές, κυρίως στη νήστιδα, τον ειλέο και τα τυφλά και σπάνια στο δωδεκαδάκτυλο (Long και συν., 1974). Συγκεκριμένα, παρατηρείται έντονη αναγεννητική δραστηριότητα στις κρύπτες του Lieberkuhn, ανάπτυξη συνδετικού ιστού στη φλεγμονώδη περιοχή και διάταξη των κρυπτών, λόγω της πίεσης από τη βλέννη και το ινιδωνεκρωτικό υλικό. Το αναγεννημένο επιθήλιο χαρακτηρίζεται από μείωση των καλυκοειδών και των κυλινδρικών κυττάρων και αντίστοιχη αύξηση του αριθμού των κυβοειδών κυττάρων. Η αναγέννηση των νεκρωμένων περιοχών έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό βραχύτερων, παχύτερων και μειωμένης απορροφητικής ικανότητας λαχνών (Long και συν., 1974; Al-Sheikly και Truscott, 1977α, β, γ).

Υπερμικροσκοπικά, στη NE οι κυρίαρχες αλλοιώσεις των εντεροκυττάρων είναι η κυστιδοποίηση της κυτταρικής μεμβράνης και η απώλεια των μικρολαχνών (Kaldhusdal και συν., 1995). Οι αλλαγές αυτές παρατηρούνται κυρίως σε νεκρωτικές περιοχές του εντερικού βλεννογόνου, οι οποίες βρίσκονται σε άμεση επαφή με το *C. perfringens*, πιθανόν λόγω της υδρόλυσης των επιθηλιακών κυτταρικών μεμβρανών από τις βακτηριακές τοξίνες. Επίσης, παρατηρούνται αλλοιώσεις στα μιτοχόνδρια των ηπατοκυττάρων, των καρδιοκυττάρων και των επιθηλιακών κυττάρων των νεφρικών σωληναρίων και κυτοπλασματική διόγκωση των ενδοθηλιακών κυττάρων των τριχοειδών αγγείων του ήπατος και των νεφρών (Vissienon και συν., 1996).

Πρόσφατες μελέτες των αρχικών σταδίων της NE αποκάλυψαν ότι οι αλλοιώσεις των λαχνών ξεκινάνε από τη βασική μεμβράνη και την πλευρική περιοχή των εντεροκυττάρων και στη συνέχεια εξαπλώνονται σε ολόκληρο το χόριο, ενώ η βλάβη του επιθηλίου παρατηρείται σε μετέπειτα στάδια εξέλιξης του νοσήματος (Olkowski και συν., 2008). Οι αλλοιώσεις αυτές οφείλονται στην προσβολή του εξωκυτταρικού υλικού και των κυτταρικών συνδέσεων, πιθανόν από βακτηριακές κολλαγενάσες, η δράση των οποίων ενισχύεται από τον τραυματισμό του βλεννογόνου που συνυπάρχει (π.χ. κοκκιδίωση) ή από τις μεταλλοπρωτεϊνάσες του ξενιστή, οι οποίες ενεργοποιούνται από την αλληλεπίδραση του βακτηρίου με τον ξενιστή (Olkowski και συν., 2008). Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι ένα πρωτοποριακό εμβόλιο κατά της NE αποτελείται από μία μεταλλοπεπτιδάση ψευδαργύρου (Kulkarni και συν., 2007).

### **2.9.2 Υποκλινική**

Η επίδραση της υποκλινικής μορφής της NE στις αποδόσεις και την ευζωία των πτηνών είναι σημαντικότερη, παρόλο που η κλινική μορφή προκαλεί υψηλά ποσοστά θνητότητας (Prescott, 1979: Kaldhusal και Hofshagen, 1992). Η υποκλινική μορφή συνήθως δεν διαγιγνώσκεται, με αποτέλεσμα να μην εφαρμόζεται θεραπεία και να ανευρίσκονται υποβαθμισμένα σφάγια κατά τον κρεοσκοπικό έλεγχο, τα οποία και απορρίπτονται. Στη Δανία και τη Νορβηγία, το ποσοστό των υποβαθμισμένων σφαγίων αυξήθηκε αμέσως μετά την απαγόρευση της χρησιμοποίησης των ΑΑΠ (Inborg, 2001).

Η υποκλινική μορφή εκδηλώνεται με καθυστέρηση στην ανάπτυξη και αύξηση του ΔΜΤ (Lovland και Kaldhusdal, 2001). Παρατηρείται τόσο μετά από φυσική μόλυνση (Kaldhusdal και Hofshagen, 1992) όσο και μετά από πειραματική μόλυνση με *C. perfringens* (Kaldhusdal και συν., 1999: Brennan και συν., 2001: Gholamiandehkordi και συν., 2007: Pedersen και συν., 2008). Σε πειραματικές συνθήκες μπορεί να αναπαραχθεί, όταν καλλιέργειες ζωμού του *C. perfringens* φυγοκεντρηθούν και τα βακτήρια πριν τον ενοφθαλμισμό επαναδιαλυθούν σε PBS, προκαλώντας ήπια νέκρωση στο δωδεκαδάκτυλο και σπανιότερα στον ειλέο (Al-Sheikly και Truscott, 1977γ). Αντίθετα, ο ενοφθαλμισμός καλλιέργειας ζωμού ή του υπερκείμενου υγρού οδηγεί σε σοβαρή νέκρωση (Al-Sheikly και Truscott, 1977 α, β).

Στην υποκλινική μορφή της NE, συνήθως, ανευρίσκονται εστίες νέκρωσης στον εντερικό βλεννογόνο, μεγέθους 1-5 mm, ελαφρώς μικρότερες από αυτές της κλασικής μορφής. Οι ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις είναι ηπιότερες και συνίστανται σε επιφανειακή νέκρωση της κορυφής των λαχνών, η οποία συνοδεύεται από διήθηση ετερόφιλων κυττάρων και αθροίσματα Gram- θετικών βακίλλων (Kaldhusdal και Hofshagen, 1992). Οι αλλοιώσεις αυτές εκτείνονται έως το χόριο και σπάνια επεκτείνονται βαθύτερα (Brennan και συν., 2001).

### **2.9.3 Χολαγγειοηπατίτιδα**

Η χολαγγειοηπατίτιδα στα κρεοπαραγωγά ορνίθια αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τους Randal και συν. (1983) στη Σκωτία και στη συνέχεια σε όλο τον κόσμο (Hutchison και Riddell, 1990: Onderka και συν., 1990: Sasaki και συν., 1997). Οι Onderka και συν. (1990) και οι Sasaki και συν. (2000) αναπαρήγαγαν τη χολαγγειοηπατίτιδα με ενοφθαλμισμό του *C. perfringens* στη χοληδόχο κύστη και απολίνωσή του κυστοεντερικού και του ηπατοεντερικού πόρου.

Η χολαγγειοηπατίτιδα τις περισσότερες φορές διαγιγνώσκεται κατά τον κρεοσκοπικό έλεγχο στα πτηνοσφαγεία. Το σφάγιο είναι ικτερικό, λόγω διαταραχής του μηχανισμού

απέκκρισης της χολής. Το ήπαρ είναι συνήθως έντονα διογκωμένο, φαιοκίτρινου χρώματος με κυψελιδωτή όψη, συχνά με αποχρωματισμένες, αστεροειδής εστίες νέκρωσης (Lovland και Kaldhusdal, 1999). Η χοληδόχος κύστη είναι διατεταμένη, λόγω της υπερπλήρωσής της με χολή και τα τοιχώματά της παχυμένα και αδιαφανή, δίνοντας τους ένα λευκωπό χρωματισμό. Η χολή μπορεί να είναι φυσιολογικής, υδαρούς ή κροκυδώδους σύστασης, κίτρινου χρώματος (Hutchinson και Riddell, 1990). Επίσης, πτηνά με χολλαγγειοηπατίτιδα πολύ συχνά εκδηλώνουν ασκίτη, λόγω ηπατικής ανεπάρκειας (Julian, 1996: Lovland και Kaldhusdal, 1999).

Οι ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις που παρατηρούνται συνήθως είναι η υπερπλασία του χοληδόχου πόρου, η ινιδοειδής νέκρωση, η χολλαγγειίτιδα και περιστασιακά η εστιακή κοκκιωματώδης φλεγμονή (Randall και συν., 1986: Onderka και συν., 1990: Lovland και Kaldhusdal, 1999: Sasaki και συν., 2000).

Το *C. perfringens* απομονώνεται συχνότερα από τη χοληδόχο κύστη, συγκριτικά με το παρέγχυμα του ήπατος. Σύμφωνα με τους Lovland και Kaldhusdal (1999), το *C. perfringens* που ανευρίσκεται στο έντερο σε υψηλό πληθυσμό διαπερνά το γαστρεντερικό βλεννογόνο φραγμό, λόγω των αλλοιώσεων του βλεννογόνου και μέσω της πυλαίας ηπατικής κυκλοφορίας φθάνει στους χοληφόρους πόρους και το ήπαρ. Η νέκρωση των ηπατικών κυττάρων οφείλεται στη διαφυγή της χολής στο ηπατικό παρέγχυμα, λόγω της έμφραξης των χοληφόρων πόρων (Hutchinson και Riddell, 1990). Οι αλλοιώσεις της χοληδόχου κύστης και των χοληδόχων πόρων και οι μεταβολές των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών της χολής είναι απόρροια της δράσης του *C. perfringens* ή/και των τοξινών του (Hutchinson και Riddell, 1990).

Τέλος, το *C. perfringens* πιθανόν να εμπλέκεται στην πρόκληση αλλοιώσεων στο μυώδη στόμαχο των πτηνών. Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί θετική συσχέτιση μεταξύ του πληθυσμού του *C. perfringens* στα τυφλά και των αλλοιώσεων του επιδερμικού χιτώνα του μυώδους στομάχου (Novoa-Garrido και συν., 2006).

### **2.10 Διάγνωση**

Η διάγνωση της NE στηρίζεται στα στοιχεία του ιστορικού, τα συμπτώματα και τις χαρακτηριστικές αλλοιώσεις. Συγκεκριμένα, η ανεύρεση νεκρών πτηνών καλής θρεπτικής κατάστασης, στα οποία η σήψη επέρχεται γρήγορα και φέρουν τις χαρακτηριστικές αλλοιώσεις στο έντερο, το ήπαρ και τη χοληδόχο κύστη, είναι ενδεικτικά της NE. Στοιχεία από το ιστορικό, όπως η εμφάνιση του νοσήματος στην ηλικία των 3-4 εβδομάδων, οι κακές συνθήκες υγιεινής της εκτροφής και η συχνή επανεμφάνισή του στην εκτροφή συμβάλλουν

σημαντικά στην εμπειρική διάγνωση του νοσήματος. Για την επιβεβαίωση της διάγνωσης της ΝΕ, απαιτείται η απομόνωση και η ταυτοποίηση του *C. perfringens*, καθώς επίσης και η διενέργεια ιστοπαθολογικών εξετάσεων δειγμάτων από τις αλλοιώσεις (Wages και Opengart, 2003: Γεωργοπούλου, 2009).

Ένα χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο, που συμβάλλει στην ταχεία διάγνωση της ΝΕ, είναι η χρώση Gram- επιχρίσματος από το βλεννογόνο και το περιεχόμενο του εντέρου, όπου ανευρίσκεται μεγάλος αριθμός Gram- θετικών βακίλλων μεμονωμένων ή/και συναθροίσεων αυτών (Ficken και Wages, 1997).

Η απομόνωση του *C. perfringens* γίνεται από το παρέγχυμα του ήπατος και συχνότερα από τη χολή. Ωστόσο, χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή για την αποφυγή επιμολύνσεων, λόγω της ταχείας μεταθανάτιας διείσδυσης του *C. perfringens* στους ιστούς και της ευρείας διασποράς του στο περιβάλλον. Η απομόνωση του *C. perfringens* από το έντερο δεν έχει ιδιαίτερη διαγνωστική αξία, επειδή αποτελεί μέρος της φυσιολογικής εντερικής μικροχλωρίδας (Shane και συν., 1984). Αντίθετα, ο ποσοτικός του προσδιορισμός στα τυφλά είναι ιδιαίτερα χρήσιμος. Πληθυσμός *C. perfringens* μεγαλύτερος από  $10^6$  cfu/g εντερικού περιεχομένου υποδηλώνει αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης ΝΕ (Kaldhusdal και συν., 1999), ενώ σε περιστατικά ΝΕ ο πληθυσμός ανέρχεται έως  $10^8$  cfu/g (Long και συν., 1974: Baba και συν., 1997). Ο προσδιορισμός του *C. perfringens* στο εντερικό περιεχόμενο μπορεί να γίνει είτε με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων (Kaldhusdal και συν., 1999) είτε με πιο σύγχρονες και ταχείες μεθόδους, όπως η ενζυμική ανοσοπροσροφητική μέθοδος (ELISA) (McCourt και συν., 2005) και η PCR (Wise και Siragusa, 2005: Si και συν., 2007).

Η απομόνωση του *C. perfringens* γίνεται μετά από αναερόβια επώαση για 24 ώρες σε αιματούχο υπόστρωμα. Οι αποικίες του *C. perfringens* είναι χαρακτηριστικές και φέρουν διπλή ζώνη αιμόλυσης. Συγκεκριμένα, παρατηρείται μία πλήρης, εσωτερική ζώνη που οφείλεται στην τοξίνη -θ και μία ατελής, εξωτερική ζώνη που οφείλεται στην τοξίνη -α (Ficken και Berkhoff, 1989). Παρά το γεγονός ότι είναι αναερόβιο βακτήριο, η ταχεία μεταφορά των βιολογικών δειγμάτων δεν είναι τόσο σημαντική, επειδή μπορεί να επιβιώσει σε βαμβακοφόρο στυλεό έως και 2 εβδομάδες (Osterblad και συν., 2003).

Η ταυτοποίηση του *C. perfringens* βασίζεται, εκτός από τα χαρακτηριστικά των αποικιών του στο αιματούχο υπόστρωμα και στα χαρακτηριστικά της ανάπτυξής του και σε άλλα υποστρώματα. Η ανάπτυξή του σε υπόστρωμα λεκίθου υποδηλώνει την ύπαρξη λεκιθινάσης και τη μη παραγωγή λιπάσης. Η καλλιέργειά του σε κανονικό υπόστρωμα λεκίθου και σε υπόστρωμα λεκίθου που περιέχει αντιτοξίνη -α, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μίας ζώνης καθίζησης γύρω από τις αποικίες στο κανονικό υπόστρωμα και



περιορισμένη ή καθόλου καθίζηση στο υπόστρωμα που περιέχει την αντιτοξίνη -α (Ficken και Wages, 1997).

Με την ELISA μπορεί να προσδιοριστεί η ποσότητα της τοξίνης -α και ο πληθυσμός του *C. perfringens* στο εντερικό περιεχόμενο (McCourt και συν., 2005). Ο ποσοστικός προσδιορισμός συμβάλλει στη διάγνωση της NE, δεδομένου ότι υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ της ποσότητας της τοξίνης -α (McCourt και συν., 2005) και του πληθυσμού *C. perfringens* (Long και συν., 1974; Baba και συν., 1997) με την εκδήλωση της NE. Επίσης, έχει παρατηρηθεί θετική συσχέτιση μεταξύ της εκδήλωσης της NE και της συχνότητας εμφάνισης της χολαγγειοηπατίτιδας με τον τίτλο των αντισωμάτων κατά της τοξίνης -α (Lovland και συν., 2003). Για τον προσδιορισμό της ποσότητας της τοξίνης -α και του πληθυσμού του *C. perfringens* στο γαστρεντερικό σωλήνα μπορεί να χρησιμοποιηθεί και η PCR (Wise και Siragusa, 2005; Si και συν., 2007).

Πολύ χρήσιμο εργαλείο για την εμπειρική διάγνωση της NE είναι η καταγραφή της συχνότητας εμφάνισης της χολαγγειοηπατίτιδας κατά τον κρεοσκοπικό έλεγχο στο σφαγείο, επειδή η αύξηση της συχνότητας εμφάνισης της χολαγγειοηπατίτιδας προηγείται της εμφάνισης της κλασικής μορφής NE (Lovland και Kaldhusdal, 1999).

Τέλος, στις περιπτώσεις όπου η διάγνωση του νοσήματος δεν μπορεί να επιβεβαιωθεί με μικροβιολογικές και ιστοπαθολογικές εξετάσεις, η ανταπόκριση των πτηνών στην θεραπεία με αντιβιοτικά μπορεί να βοηθήσει στην εμπειρική της διάγνωση. Αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται είναι η tylosin, η penicillin και τα παράγωγά της (Pattison, 2002). Ωστόσο, η NE δεν αποτελεί τη μοναδική αιτία βακτηριακής εντερίτιδας και ούτε η δράση των αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται είναι ειδική μόνο κατά του *C. perfringens* (Wilson και συν., 2005).

### **2.11 Διαφορική διάγνωση**

Η NE πρέπει να διαφοροποιείται από την ελκωτική εντερίτιδα (*Clostridium colinum*) και την κοκκιδίωση από *E. brunneti* ή *E. maxima* (Wages και Opengart, 2003).

Η διαφορική διάγνωση της NE από την ελκωτική εντερίτιδα βασίζεται στη διαφορετική εντόπιση, μορφή και σοβαρότητα των αλλοιώσεων. Η επιβεβαίωση γίνεται με την απομόνωση και την ταυτοποίηση του αιτιολογικού παράγοντα από τις αλλοιώσεις. Συγκεκριμένα, στην ελκωτική εντερίτιδα οι αλλοιώσεις συνίστανται σε ελκωτικές, νεκρωτικές εστίες οι οποίες εντοπίζονται κυρίως στα τυφλά και σπανιότερα στον ειλέο και τη νήστιδα, ενώ πολύ συχνά παρατηρείται και περιτονίτιδα, λόγω της διάτρησης του εντερικού τοιχώματος (Wages, 2003).

Η προσβολή των ορνιθίων από *E. brunetti* ή *E. maxima* πολύ συχνά δυσχεραίνουν τη διάγνωση της ΝΕ, λόγω της κοινής εντόπισης στη νήστιδα και τον ειλεό. Η μικροσκοπική εξέταση νωπού επιχρίσματος από τον εντερικό βλεννογόνο αποκαλύπτει την παρουσία άφθονων παρασιτικών στοιχείων σε διάφορα στάδια του πολλαπλασιασμού τους (McDougald, 2003). Ωστόσο, η διάγνωση πρέπει να επιβεβαιώνεται με μικροβιολογικές και ιστοπαθολογικές εξετάσεις, επειδή πολλές φορές η κοκκιδίωση συνυπάρχει ή προηγείται της ΝΕ (Helmboldt και Bryant, 1971: Long και συν., 1974: Broussard και συν., 1986).

Τέλος, όσον αφορά τη χολαγγειοηπατίτιδα πρέπει να διαφοροποιείται από παθολογικές καταστάσεις στις οποίες παρατηρείται ηπατίτιδα, όπως τις μυκοτοξινώσεις, την ηπατίτιδα με έγκλειστα, το σύνδρομο πνευμονικής υπέρτασης κ.ά. (Hutchison και Riddell, 1990: Onderka και συν., 1990: Γεωργοπούλου, 2009).

## **2.12 Θεραπεία**

Το *C. perfringens* in vitro είναι ευαίσθητο στην tetracycline, τις β-λακτάμες και τα μακρολίδια (Johansson, 2006). Επίσης, είναι ευαίσθητο στα ιονοφόρα αντικοκκιδιακά monensin (Elwinger και συν., 1998), salinomycin (Johansen και συν., 2007) και ιδιαίτερα στη narasine (Brennan και συν., 2001), τα οποία χρησιμοποιούνται για την πρόληψη της κοκκιδίωσης (Watkins και συν., 1997: Martel και συν., 2004). Στην πράξη, για την αποτελεσματική θεραπεία των κλινικών περιστατικών της ΝΕ χρησιμοποιούνται αντιβιοτικά με το πόσιμο νερό, όπως η amoxicillin, η penicillin (Gadbois και συν., 2008), η lincomycin (Hamdy και συν., 1983), η tylosin (Brennan και συν., 2001), η erythromycin και η tetracycline (Bains, 1968).

Για την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας λαμβάνεται υπόψη η ανταπόκριση των πτηνών, όσον αφορά τη νοσηρότητα, τη θνητότητα, την καθυστέρηση στην ανάπτυξη και τη μετατρεψιμότητα της τροφής. Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά από το *C. perfringens* δεν είναι συχνή, με εξαίρεση την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στην tetracycline (Lyras και Rood, 1996: Johansson και συν., 2004). Το *C. perfringens* μπορεί να φέρει τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στην tetracycline *tetA(P)*, *tetB(P)*, *tetA408(P)*, *tetM* και *tetQ* (Lyras και Rood, 1996: Sasaki και συν., 2001: Martel και συν., 2004: Kather και συν., 2006). Επίσης, αναφέρεται συχνά ανάπτυξη ανθεκτικότητας στη lincomycin (Martel και συν., 2004), ενώ σπάνια αναφέρεται για την ampicillin, την erythromycin και την tylosin (Devriese και συν., 1993: Watkins και συν., 1997: Sasaki και συν., 2001: Johansson και συν., 2004: Martel και συν., 2004).

### **2.13 Σχέση με τη δημόσια υγεία**

Η παρουσία του *C. perfringens* στο γαστρεντερικό σωλήνα των πτηνών αποτελεί κίνδυνο για τη δημόσια υγεία, λόγω της δυνητικής του μετάδοσης στον άνθρωπο, μέσω της τροφικής αλυσίδας (Immerseel και συν., 2004). Η ικανότητα του *C. perfringens* να σπορογονεί και να αναπτύσσεται σε μεγάλο εύρος θερμοκρασίας είναι χαρακτηριστικά που του επιτρέπουν να επιβιώνει και να πολλαπλασιάζεται στα τρόφιμα (Brynstad και Granum, 2002). Ιδιαίτερα, τρόφιμα τα οποία έχουν υποστεί θερμική επεξεργασία, στη συνέχεια ψύχονται αργά και μετά αναθερμαίνονται αποτελούν παράγοντα υψηλού κινδύνου για την πρόκληση τροφογενούς λοίμωξης στον άνθρωπο (Andersson και συν., 1995).

Λόγω της σπάνιας επιδημιολογικής διερεύνησης των τροφογενών λοιμώξεων με ήπια συμπτωματολογία, η συχνότητα εμφάνισης της τροφογενούς λοίμωξης από *C. perfringens* είχε υποτιμηθεί. Ωστόσο, στη Νορβηγία το *C. perfringens* αποτελούσε τη συχνότερη αιτία τροφογενούς λοίμωξης τη δεκαετία του 1990 (Brynstad και Granum, 2002). Ο επιπολασμός της σε άλλες χώρες, όπως την Ιαπωνία, τις ΗΠΑ και το ΗΒ, ήταν επίσης υψηλός (Labbe, 2000: Brynstad και Granum, 2002). Στην Αγγλία και την Ουαλία, το *C. perfringens* ήταν το δεύτερο σε συχνότητα βακτήριο που απομονωνόταν από τροφογενείς λοιμώξεις τη δεκαετία 1980-1990 (Kessel και συν., 2001).

Η επιδημιολογική διερεύνηση περιστατικών τροφογενούς λοίμωξης έχει ενοχοποιήσει το ορνίθιο κρέας ως πηγή μόλυνσης με *C. perfringens* (Schiemann, 1977: Hook και συν., 1996: Miwa και συν., 1997: 1998). Συγκεκριμένα, από δείγματα εντερικού περιεχομένου από μόσχους, χοιρινά και ορνίθια το *C. perfringens* απομονώθηκε από το 76%, το 44% και το 80% των δειγμάτων, αντίστοιχα (Miwa και συν., 1997). Από τα απομονωθέντα στελέχη εντεροτοξινογόνα ήταν το 26%, το 22% και το 40%, αντίστοιχα στα προαναφερθέντα είδη. Η υψηλή αναλογία εντεροτοξινογόνων στελεχών *C. perfringens* που παρατηρήθηκε στα ορνίθια οφείλεται στις εντατικές συνθήκες εκτροφής ή στην πιθανή ευαισθησία των ορνιθίων στην εγκατάσταση εντεροτοξινογόνων στελεχών (Miwa και συν., 1997).

Ένας μικρός αριθμός στελεχών *C. perfringens* ικανών να παράγουν εντεροτοξίνη συνυπάρχει με μεγάλο αριθμό μη εντεροτοξινογόνων στελεχών στα ορνίθια (Miwa και συν., 1996). Για αυτόν το λόγο, η καλλιέργεια εντερικού περιεχομένου ή κοπράνων και η επιλογή αποικιών για περαιτέρω χαρακτηρισμό πιθανόν να οδηγήσει σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Για τον αποτελεσματικό προσδιορισμό του επιπολασμού των στελεχών *C. perfringens*, θετικών ως προς την παραγωγή εντεροτοξίνης και της συμβολής του ορνιθίου κρέατος στην εκδήλωση τροφογενών δηλητηριάσεων στους ανθρώπους είναι

απαραίτητη η διενέργεια περισσότερων επιδημιολογικών μελετών με ακόμη πιο ευαίσθητες τεχνικές (Immerseel και συν., 2004).

#### **2.14 Πειραματικά μοντέλα αναπαραγωγής**

Το *C. perfringens*, παρά το γεγονός ότι είναι αποδεδειγμένα ο αιτιολογικός παράγοντας της NE δεν υπακούει στο αξίωμα του Koch, επειδή απομονώνεται από υγιή ορνίθια, καθώς επίσης η μόλυνση των ορνιθίων μόνο με *C. perfringens* δεν οδηγεί πάντα στην αναπαραγωγή της NE (Parish, 1961: Shane και συν., 1984: Craven και συν., 1999: Kaldhusdal και συν., 1999: Drew και συν., 2004). Για αυτόν το λόγο, στα περισσότερα πειραματικά μοντέλα αναπαραγωγής της NE, η μόλυνση των πτηνών με *C. perfringens* συνδυάζεται με έναν ή περισσότερους προδιαθεσικούς παράγοντες, έτσι ώστε να διαμορφώνονται κατάλληλα οι συνθήκες στο γαστρεντερικό σωλήνα και να ευνοείται ο πολλαπλασιασμός και η τοξινογένεση του *C. perfringens* (Williams και συν., 2003: McReynolds και συν., 2004: Gholamiandehkordi και συν., 2007).

Για την αποτελεσματική αναπαραγωγή της NE απαιτείται ο προηγούμενος τραυματισμός του εντερικού επιθηλίου και η διαφυγή πρωτεϊνών του πλάσματος στο γαστρεντερικό σωλήνα, δημιουργώντας ευνοϊκό περιβάλλον για τον πολλαπλασιασμό του *C. perfringens* και την παραγωγή τοξινών. Αυτό πολύ συχνά επιτυγχάνεται με τη μικτή μόλυνση των ορνιθίων με *C. perfringens* και *Eimeria* spp. (Al-Sheikhly και Al-Saieg, 1980: Williams και συν., 2003). Όμως, η μικτή μόλυνση καθιστά δύσκολη έως αδύνατη την εφαρμογή της σε ανοσολογικές μελέτες, δεδομένου ότι δεν μπορεί να διαχωριστεί η ανοσολογική αντίδραση του πτηνού κατά του *Eimeria* spp., από την ανοσολογική αντίδραση πτηνού κατά του *C. perfringens* (Gholamiandehkordi και συν., 2007).

Η ανεπάρκεια αναφορών στη διεθνή βιβλιογραφία για τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην παθογένεια της NE και τους παράγοντες που προδιαθέτουν στην εκδήλωσή της, έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία καθιέρωσης ενός καθολικού, αξιόπιστου και με επαναληψιμότητα πειραματικού μοντέλου αναπαραγωγής της NE (McDevitt και συν., 2006).

Ωστόσο, κάποιοι ερευνητές μπόρεσαν και αναπαρήγαγαν πειραματικά τη NE, χρησιμοποιώντας καλλιέργειες από βλαστικά κύτταρα τα οποία δεν είχαν υποστεί πλύση (Long και Truscott, 1976: Al-Sheikhly και Truscott, 1977a: Bernier και συν., 1977: Prescott, 1979: Cowen και συν., 1987: Branton και συν., 1997). Οι Long και Truscott (1976) χρησιμοποίησαν καθαρή καλλιέργεια για την αναπαραγωγή του νοσήματος. Το ποσοστό θνητότητας κυμαινόταν από 1% έως 28%. Το μοντέλο αυτό τροποποιήθηκε στη συνέχεια,

ενσωματώνοντας στο σιτηρέσιο των ορνθίων το ιχθυάλευρο σε υψηλές συγκεντρώσεις και χορηγώντας τη μολύνουσα δόση ενδοδωδεκαδακτυλικά (Al-Sheikhly και Truscott, 1977a).

Ο ενδοδωδεκαδακτυλικός ενοφθαλμισμός των πτηνών με *C. perfringens*, παρακάμπτοντας το υπερόξινο περιβάλλον του αδενώδους στομάχου, είναι αποτελεσματικός, όσον αφορά την εγκατάσταση του *C. perfringens* στο γαστρεντερικό σωλήνα. Ωστόσο, η μέθοδος είναι αρκετά δύσκολη, δεν μιμείται κανέναν από τους φυσιολογικούς τρόπους μόλυνσης και δεν μπορεί να έχει ευρεία εφαρμογή, παρά μόνο σε μικρό αριθμό πειραματόζωων (Williams και συν., 2003).

Οι Hamdy και συν. (1983) χρησιμοποίησαν μολυσμένη στρωμή από περιστατικό NE και κατάφεραν να αναπαράγουν το νόσημα. Οι Cowen και συν. (1987) χρησιμοποιώντας καλλιέργεια ζωμού *C. perfringens*, σε συνδυασμό με στρωμή μολυσμένη από περιστατικό NE, ήταν επίσης σε θέση να αναπαράγουν τη νόσο.

Η μόλυνση των ορνθίων με *E. acervulina*, πριν τη μόλυνση με *C. perfringens*, αύξησε σημαντικά το ποσοστό θνητότητας (από 28% σε 53%) (Al-Sheikhly και Al-Saieg, 1980). Πιο πρόσφατα, οι Williams και συν. (2003) αναπαρήγαν πειραματικά τη NE με μικτή μόλυνση *C. perfringens* και *E. maxima*.

Επίσης, οι Jansman και συν. (2003) παρουσίασαν ένα μοντέλο πρόκλησης υποκλινικής NE βασιζόμενο στο συνδυασμό μόλυνσης με *E. acervulina* στην ηλικία των 10 ημερών και με *C. perfringens* στην ηλικία των 14-16 ημερών. Η μικτή μόλυνση είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της καταναλισκόμενης τροφής και του ΣΒ κατά 15% και 23%, αντίστοιχα, και την αύξηση του ΔΜΤ κατά 10%, συγκριτικά με τους μάρτυρες. Οι αλλοιώσεις NE εκδηλώθηκαν στο 50% των πτηνών που μολύνθηκαν.

Οι McReynolds και συν. (2004) περιέγραψαν την αναπαραγωγή του νοσήματος, χρησιμοποιώντας παράγοντες καταπόνησης, όπως πολλαπλάσια δόση εμπορικού εμβολίου κατά της κοκκιδίωσης και κατά της IBD.

Η καθιέρωση ενός πειραματικού μοντέλου με ομοιομορφία σε όλες τις επιμέρους παραμέτρους θα επιτρέψουν περαιτέρω πρόοδο στην ανάπτυξη νέων μεθόδων πρόληψης της NE και στην εκτίμηση της αποτελεσματικότητάς τους, καθώς και τη συγκριτική μελέτη των αποτελεσμάτων τους, με στόχο τον καλύτερο έλεγχο της NE στα κρεοπαραγωγά ορνίθια (Gholamiandehkordi και συν., 2007).

### **3. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ**

#### **3.1 Γενικά**

Ο περιορισμός της διατροφής αποτελεί μία στρατηγική διαχείρισης της κατανάλωσης τροφής και του ρυθμού ανάπτυξης των πτηνών με αρκετές εφαρμογές στη συστηματική πτηνοτροφία. Αποτελεί την κατεξοχήν μέθοδο ελέγχου και πρόληψης των μεταβολικών (Julian, 1997: Gonzales και συν., 1998) και των μυοσκελετικών (Julian, 1998: Lee και Leeson, 2001) παθολογικών καταστάσεων που εκδηλώνονται στα σύγχρονα ταχέως αναπτυσσόμενα κρεοπαραγωγά ορνίθια.

#### **3.2 Μέθοδοι περιορισμού της διατροφής**

Ο περιορισμός της διατροφής των πτηνών εφαρμόζεται κυρίως για την επιβράδυνση του ρυθμού ανάπτυξης, καθώς επίσης για προληπτικούς και θεραπευτικούς σκοπούς. Στόχος του περιορισμού είναι να μειώσει την παρουσία των θρεπτικών συστατικών στο γαστρεντερικό σωλήνα των πτηνών, έτσι ώστε ούτε το πτηνό αλλά ούτε και τα παθογόνα βακτήρια να μπορούν να τα εκμεταλλευτούν. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί είτε με τον ποσοτικό είτε με τον ποιοτικό περιορισμό της διατροφής (Urdaneta Rincon, 2000).

##### **3.2.1 Ποσοτικός περιορισμός της διατροφής**

###### **3.2.1.1 Φυσικός περιορισμός της διατροφής**

Η εφαρμογή του φυσικού περιορισμού της διατροφής δεν εφαρμόζεται συχνά, παρά το γεγονός ότι είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική. Η μειωμένη συχνότητα εφαρμογής του φυσικού περιορισμού της διατροφής οφείλεται στο αυξημένο κόστος, για το επιπλέον εργατικό δυναμικό που απαιτείται για την τακτική ζύγιση των πτηνών και τον υπολογισμό της κατανάλωσης τροφής σε ημερήσια βάση. Επίσης, είναι απαραίτητη η προσθήκη επιπρόσθετων τροφοδόχων, προκειμένου να αποφευχθεί ο ανταγωνισμός μεταξύ των πτηνών και η ανομοιομορφία στην ανάπτυξη του σμήνους (Urdaneta Rincon, 2000).

Τα προγράμματα φυσικού περιορισμού της διατροφής έχουν μελετηθεί επαρκώς σε διάφορες μελέτες, με ποικίλα αποτελέσματα, ανάλογα με την ηλικία των πτηνών, τη διάρκεια και την ένταση του περιορισμού της διατροφής (Yu και συν., 1990: Scheideler και Baughman, 1993: Zhong και συν., 1995).

### **3.2.1.2 Περιορισμός της διατροφής μέσω του προγράμματος φωτισμού**

Το πιο διαδεδομένο πρόγραμμα φωτισμού, το οποίο πρότειναν οι εταιρείες προμήθειας των νεοσσών ήταν 23 ώρες φως και 1 ώρα σκοτάδι, επειδή θεωρούσαν ότι με αυτό το πρόγραμμα η κατανάλωση τροφής ήταν μεγαλύτερη και η αύξηση των πτηνών ταχύτερη. Είναι γνωστό ότι μεταβάλλοντας το πρόγραμμα φωτισμού, είτε μειώνοντας τη διάρκεια φωτισμού είτε εφαρμόζοντας εναλλασσόμενα διαστήματα φωτός και σκότους, βελτιώνεται η αξιοποίηση της τροφής (Blair και συν., 1993: Buys και συν., 1998: Apeldoorn και συν., 1999).

Κατά τη διάρκεια του σκότους, οι ενεργειακές ανάγκες συντήρησης των πτηνών είναι μικρότερες και ταυτόχρονα περιορίζεται και η κατανάλωση τροφής (Buyse και συν., 1996). Ωστόσο, όταν οι ώρες φωτός είναι πολύ περιορισμένες, τα πτηνά προσαρμόζονται και μαθαίνουν να καταναλώνουν τροφή και κατά τη διάρκεια του σκότους (Morris, 1968).

Η εφαρμογή των προγραμμάτων φωτισμού για τον περιορισμό της διατροφής έχει τα πλεονεκτήματα της μείωσης της καταναλισκόμενης ηλεκτρικής ενέργειας, της καλύτερης αξιοποίησης της τροφής και της μείωσης της συχνότητας εμφάνισης των μυοσκελετικών διαταραχών και του συνδρόμου αιφνίδιων θανάτων, χωρίς να επηρεάζεται το ΣΒ στην ηλικία κατά τη σφαγή (Urdaneta Rincon, 2000).

Ο γενότυπος και το φύλο των πτηνών, η σύνθεση του σιτηρεσίου, η φόρτιση δαπέδου και το ταϊστικό διάστημα είναι τα κύρια στοιχεία που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα των προγραμμάτων φωτισμού και πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την κατάρτισή τους (Urdaneta Rincon, 2000).

### **3.2.2 Ποιοτικός περιορισμός της διατροφής**

#### **3.2.2.1 Περιορισμός της διατροφής με την προσθήκη άπεπτων συστατικών στο σιτηρέσιο**

Για τον περιορισμό της διατροφής μπορεί εναλλακτικά να προστεθούν στο σιτηρέσιο των πτηνών πρώτες ύλες, οι οποίες δεν μπορούν να διασπαστούν από το πεπτικό τους σύστημα, όπως είναι οι φυτικές ίνες, ο φλοιός βρώμης και ο φλοιός ρυζιού. Στόχος της αραίωσης του σιτηρεσίου είναι η μείωση της πυκνότητας των θρεπτικών συστατικών, χωρίς ωστόσο να προκαλεί ανομοιομορφία στην ανάπτυξη του σμήνους (Urdaneta Rincon, 2000).

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στο γεγονός, ότι τα κρεοπαραγωγά ορνίθια καταναλώνουν τη μέγιστη ποσότητα τροφής που τους επιτρέπει η φυσική χωρητικότητα του γαστρεντερικού τους σωλήνα (Newcombe και Summers, 1984). Ωστόσο, στην αρχή της χορήγησης του αραιωμένου σιτηρεσίου τα πτηνά αυξάνουν αντισταθμιστικά την καταναλισκόμενη ποσότητα

τροφής, προκειμένου να ικανοποιήσουν τις ενεργειακές τους ανάγκες (Leeson και συν., 1991).

Σύμφωνα με τους Leeson και συν. (1992), τα πτηνά τα οποία κατανάλωσαν αραιωμένο σιτηρέσιο είχαν υψηλότερο ΣΒ στο τελικό στάδιο αύξησης, συγκριτικά με τα πτηνά που κατανάλωσαν ισορροπημένο σιτηρέσιο. Αυτό πιθανόν οφείλεται, στην αξιοποίηση των θεωρητικά άπεπτων πρώτων υλών που προστίθενται για την αραιώση του σιτηρεσίου και στην πρόσληψη ενέργειας και θρεπτικών συστατικών από αυτά (Leeson και συν., 1992: Leeson και Zubair, 1997).

### **3.2.2.2 Περιορισμός της διατροφής με σιτηρέσια χαμηλής περιεκτικότητας σε θρεπτικά συστατικά**

Η χρησιμοποίηση σιτηρεσίων χαμηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες ή ενέργεια αποτελεί μία ακόμη μέθοδο για τη μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των κρεοπαραγωγών ορνιθίων. Η μέθοδος αυτή έχει το πλεονέκτημα ότι δεν απαιτεί επιπλέον εργατικό κόστος για τη ζύγιση της τροφής (Urdaneta Rincon, 2000).

Για τη μέγιστη αύξηση του ΣΒ των κρεοπαραγωγών ορνιθίων, τα σιτηρέσια ανάπτυξης, αύξησης και πάχυνσης πρέπει να περιέχουν 23%, 20% και 18% ολικές πρωτεΐνες, αντίστοιχα, και 3200 kcal ME ανά Kg σιτηρεσίου (National Research Council, 1994). Όταν τα πτηνά διατρέφονται με σιτηρέσιο χαμηλής περιεκτικότητας σε θρεπτικά συστατικά, τότε αντισταθμιστικά αυξάνουν την καταναλισκόμενη ποσότητα τροφής, προκειμένου να ικανοποιήσουν τις ανάγκες σε θρεπτικά συστατικά (Leeson και Summers, 1997).

### **3.2.2.3 Περιορισμός της διατροφής με τη μεταβολή των φυσικών χαρακτηριστικών του σιτηρεσίου**

Η χορήγηση της τροφής σε αλευρώδη μορφή σε διάφορα στάδια της ανάπτυξης των πτηνών μπορεί να λειτουργήσει ως μέθοδος περιορισμού της διατροφής (Urdaneta Rincon, 2000). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα πτηνά αφιερώνουν περισσότερο χρόνο για την πρόσληψη της τροφής και καταναλώνουν περισσότερη ενέργεια, συγκριτικά με τη μορφή συμπήκτων (Jensen και συν., 1962: Savory, 1974).

Το μέγεθος των σωματιδίων της τροφής επηρεάζει, επίσης, την ανάπτυξη και το ΣΒ των πτηνών (Reece και συν., 1985: Havenstein και συν., 1994: Jones και συν., 1995). Τα κρεοπαραγωγά ορνίθια, που διατρέφονται με σιτηρέσια με τη μορφή τριμμάτων και συμπήκτων, έχουν ταχύτερο ρυθμό αύξησης ΣΒ και καλύτερη πρόσληψη και αξιοποίηση της τροφής, συγκριτικά με πτηνά που διατρέφονται με σιτηρέσιο σε αλευρώδη μορφή (Calet, 1965). Ωστόσο, όταν το σιτηρέσιο παρέχεται με τη μορφή συμπήκτων, τα πτηνά εμφανίζουν



υψηλότερα ποσοστά θνητότητας, συγκριτικά με τα πτηνά που καταναλώνουν σιτηρέσιο σε αλευρώδη μορφή, λόγω της μειωμένης κινητικής δραστηριότητας (Nir και συν., 1995).

### **3.2.2.4 Περιορισμός της διατροφής με την προσθήκη χημικών ή φαρμακευτικών ουσιών**

Η χρησιμοποίηση χημικών ή φαρμακευτικών ουσιών έχει επίσης εφαρμοστεί για τον περιορισμό της διατροφής των κρεοπαραγωγών ορνιθίων και των γεννητόρων (Urdaneta Rincon, 2000). Η προσθήκη 1,5% ή 3% γλυκολικού οξέος, από την 7<sup>η</sup> έως τη 14<sup>η</sup> ημέρα της ζωής των πτηνών, περιορίζει σημαντικά την κατανάλωση τροφής και οδηγεί σε μείωση του ΣΒ κατά 22% και 50%, αντίστοιχα (Pinchasov και Jensen, 1989).

Η phenylpropranolamine και η monensin έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για τον περιορισμό της κατανάλωσης τροφής (Silverstone και Kyriakides, 1982: Oyawoye και Krueger, 1990). Η phenylpropranolamine δεν χρησιμοποιείται ευρέως, επειδή τα πτηνά αναπτύσσουν συχνά ανθεκτικότητα (Oyawoye και Krueger, 1990). Η monensin είναι ιονοφόρο αντικοκκιδιακό, το οποίο όταν χορηγηθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις στα πτηνά μειώνει την όρεξη για κατανάλωση τροφής (Cervantes και Jensen, 1984).

Οι Pinchasov και Elmaliah (1994) χρησιμοποίησαν 1-3% οξικό και προπιονικό οξύ, με αποτέλεσμα τη μείωση του ΣΒ. Οι Decuyperre και συν. (1994) χρησιμοποίησαν άλευρο του φυτού *simmondsia californica* στα σιτηρέσια πατρογονικών σμηνών για τη μείωση της καταναλισκόμενης ποσότητας τροφής. Η δράση του αλεύρου οφείλεται στο συστατικό *simmondsin*, το οποίο προκαλεί μείωση της όρεξης για κατανάλωση τροφής (Decuyperre και συν., 1994).

Η χρησιμοποίηση χημικών ή φαρμακευτικών ουσιών ως ποιοτική μέθοδος περιορισμού της διατροφής έχει το πλεονέκτημα της ομοιόμορφης κατανομής της τροφής μεταξύ των πτηνών, με αποτέλεσμα να μην παρατηρείται ανομοιομορφία στην ανάπτυξη των πτηνών (Urdaneta Rincon, 2000).

### **3.3 Επίδραση του περιορισμού της διατροφής στις αποδόσεις**

Στα κρεοπαραγωγά ορνίθια ο περιορισμός της διατροφής εφαρμόζεται είτε στην αρχή της ανάπτυξης είτε στο τέλος (Zhan και συν., 2007), με στόχους 1) την εκμετάλλευση της αντισταθμιστικής ανάπτυξης (Zubair και Leeson, 1996: Shariatmadari και Torshizi, 2004), 2) τη βελτίωση του ΔΜΤ, 3) την επιβράδυνση του ρυθμού ανάπτυξης (Zubair και Leeson, 1994) και 4) τον περιορισμό της εναπόθεσης λίπους στο σφάγιο του πτηνού (Plavnik και Hurwitz, 1991: Benyi και Habi, 1998).

Η αβγοπαραγωγική ικανότητα των ορνίθων μειώνεται με την πάροδο του χρόνου, με αποτέλεσμα η εκτροφή τους να είναι οικονομικά ασύμφορη (Holt, 2003). Σε αυτές τις περιπτώσεις, οι περισσότεροι πτηνοτρόφοι εφαρμόζουν πτερόρροια, με στόχο την επαναχρησιμοποίηση του σμήνους για δύο ή και περισσότερες αβγοπαραγωγικές περιόδους (Park και συν., 2004). Παρόλο που υπάρχουν αρκετές μέθοδοι για την πρόκληση πτερόρροιας, ο πιο συνηθισμένος τρόπος είναι ο περιορισμός της διατροφής έως την απώλεια του 25-35% του ΣΒ (Bell, 1987: USDA, 2000). Ο περιορισμός της διατροφής εφαρμόζεται, κυρίως, με στόχο τη στέρηση θρεπτικών συστατικών, την πρόκληση ψυχολογικής καταπόνησης και τελικά τη διακοπή της ωοτοκίας (Αρτοποιός, 1992: Webster, 2003).

Στους γεννήτορες ο περιορισμός της διατροφής εφαρμόζεται κυρίως στα αρχικά στάδια ανάπτυξης με στόχους την ομοιόμορφη ανάπτυξη του σμήνους, την αποφυγή της υπερβολικής εναπόθεσης λίπους και των προβλημάτων γονιμότητας που αυτή προκαλεί, καθώς επίσης για τη βελτίωση της αβγοπαραγωγής, της γονιμότητας και της εκκολαπτικότητας (McDaniel και συν., 1981: Hocking και συν., 1987, 1989: Fattori και συν., 1991: Yu και συν., 1992: Hocking και συν., 1993).

### **3.4 Επίδραση του περιορισμού της διατροφής στην ευζωία**

Ο περιορισμός της διατροφής των κρεοπαραγωγών ορνιθίων θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και ως μέθοδος βελτίωσης των συνθηκών ευζωίας τους. Τα σύγχρονα κρεοπαραγωγά ορνίθια, λόγω της μεγάλης κατανάλωσης τροφής και του υψηλού ρυθμού ανάπτυξης παρουσιάζουν πολύ συχνά μυϊκές κακώσεις και καταπόνηση των αρθρώσεων, όπως φαίνεται και από τις υψηλές τιμές των ενζύμων, γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) και κρεατινικής κινάσης (CK), που παρατηρούνται στον ορό του αίματος. Ο περιορισμός της διατροφής μπορεί να αναστείλει την εκδήλωση μυϊκών κακώσεων και να μειώσει τις τιμές της CK στον ορό του αίματος, λόγω της καθυστέρησης στην ανάπτυξη που προκαλεί (Hocking και συν., 1993: 1994).

### **3.5 Επίδραση του περιορισμού της διατροφής στην υγεία**

Ο περιορισμός της διατροφής έχει εφαρμοστεί και για θεραπευτικούς σκοπούς, κυρίως σε παθολογικές καταστάσεις που εντοπίζονται στο πεπτικό σύστημα. Σύμφωνα με τους Zulkifli και συν. (1993), πτηνά τα οποία κατανάλωσαν λιγότερη τροφή κατά 60% και 80%, είχαν ηπιότερες αλλοιώσεις κοκκιδίωσης, μετά από πειραματική μόλυνση με *E. tenella*, συγκριτικά με τα πτηνά που κατανάλωσαν τροφή κατά βούληση. Επίσης, πτηνά στα οποία περιορίστηκε η κατανάλωση τροφής για μία έως πέντε ημέρες είχαν μικρότερο βαθμό

αλλοιώσεων μετά από πειραματική μόλυνση με *E.coli*, συγκριτικά με πτηνά τα οποία διατράφηκαν κατά βούληση (Boa-Ampronsem και συν., 1997). Οι Tottori και συν. (1997) εφάρμοσαν φυσικό περιορισμό της τροφής για δώδεκα ώρες, από τη 15<sup>η</sup> έως την 35<sup>η</sup> ημέρα της ζωής των πτηνών και παρατήρησαν μείωση της θνητότητας κατά 12%.

Στα κρεοπαραγωγά ορνίθια, ο περιορισμός της διατροφής εφαρμόζεται επίσης μία ημέρα πριν τη μεταφορά τους στο πτηνοσφαγείο. Σκοπός του περιορισμού είναι η κένωση του γαστρεντερικού σωλήνα και ο περιορισμός της μετάδοσης παθογόνων για τον άνθρωπο βακτηρίων που αναπτύσσονται στο πεπτικό σύστημα των πτηνών, όπως η *Salmonella* spp., το *Campylobacter* spp. και το *C. perfringens* (Wabeck, 1972: Byrd και συν., 1998: Hinton και συν., 2000).

## **4. ΦΟΡΤΙΣΗ ΔΑΠΕΔΟΥ**

### **4.1 Γενικά**

Η φόρτιση δαπέδου της εκτροφής επηρεάζει σημαντικά την εξέλιξη και την πρόοδο της συστηματικής πτηνοτροφίας, επειδή ο αριθμός των πτηνών ανά m<sup>2</sup> διαθέσιμου χώρου έχει άμεση επίδραση τόσο στα έσοδα του πτηνοτρόφου όσο και στην ευζωία των πτηνών. Ο καθορισμός των ορίων της φόρτισης δαπέδου βασίζεται σε οικονομικές παραμέτρους, χωρίς να λαμβάνονται υπόψιν οι φυσιολογικές ανάγκες των πτηνών, με αποτέλεσμα πολλές φορές να παρατηρείται μείωση των αποδόσεων ανά πτηνό, υποβάθμιση της ευζωίας και εκδήλωση παθολογικών καταστάσεων (Estevez, 2007).

Η συνολική ποσότητα ορνίθιου κρέατος που παράγεται ανά μονάδα διαθέσιμου χώρου σε συνθήκες υψηλής φόρτισης αυξάνεται, με αποτέλεσμα την αύξηση των εσόδων για τον πτηνοτρόφο, παρά το γεγονός ότι η απόδοση ανά ορνίθιο είναι μικρότερη (Proudfoot και συν., 1979: Shanawany, 1988: Cravener και συν., 1992: Puroh και συν., 1995). Ωστόσο, η σχέση της φόρτισης δαπέδου και του οικονομικού οφέλους δεν είναι γραμμική. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι μετά από κάποιο όριο η απόδοση ανά πτηνό γίνεται τόσο μικρή, με συνέπεια τη συνολική μείωση της απόδοσης της εκτροφής (Puroh και συν., 1995).

Οι αρνητικές συνέπειες της αυξημένης φόρτισης περιλαμβάνουν 1) *τη μείωση της καταναλισκόμενης ποσότητας τροφής και του σωματικού βάρους κατά τη σφαγή* (Cravener και συν., 1992: Feddes και συν., 2002: Dozier και συν., 2005: 2006), 2) *την αύξηση του ΔΜΤ* (Tomhave και Seeger, 1945: Shanawany, 1988: Bilgili και Hess, 1995), 3) *την αύξηση της συχνότητας εμφάνισης της λοιμώδους ποδοδερματίτιδας* (Ekstrand και συν., 1997) και 4) *την ποιοτική υποβάθμιση των σφαγίων* (Proudfoot και συν., 1979). Επίσης, σε ορισμένες μελέτες έχει αναφερθεί 5) *εκδήλωση ψυχολογικής καταπόνησης από τα πτηνά* (Estevez και συν., 1997: Pettit-Riley και Estevez, 2001: Heckert και συν., 2002) και 6) *αύξηση του ποσοστού θνητότητας και της χονδροδυσπλασίας της κνήμης* (Sanotra και συν., 2001β).

Οι παραπάνω αρνητικές συνέπειες της αυξημένης φόρτισης δαπέδου και ιδιαίτερα η επίδραση στην ευζωία και την υγεία των πτηνών, αποτελούν τις σημαντικότερες αιτίες για την ολοένα αυξανόμενη αντίδραση της ΕΕ και των φιλοζωικών οργανώσεων για τον καθορισμό ανώτατου ορίου φόρτισης δαπέδου. Αποτέλεσμα της πίεσης ήταν η θέσπιση της οδηγίας 2007/43/ΕΚ από την ΕΕ, η οποία καθορίζει τη μέγιστη φόρτιση δαπέδου στα 33 Kg/m<sup>2</sup>. Υπό ορισμένες συνθήκες, με αποτελεσματικό εξαερισμό και σύστημα ελέγχου της θερμοκρασίας, η φόρτιση μπορεί να φτάσει έως και τα 39 Kg/m<sup>2</sup>.

Ο καθορισμός ανώτατων ορίων φόρτισης δαπέδου, ο οποίος να βασίζεται σε επιστημονικά δεδομένα δεν είναι τόσο εύκολος. Σύμφωνα με τον Estevez (2007), οι δυσκολίες για τον καθορισμό ανώτατου ορίου φόρτισης δαπέδου οφείλονται στα εξής δεδομένα:

- Η υποβάθμιση του επιπέδου υγείας και ευζωίας των πτηνών είναι προοδευτική, με αποτέλεσμα να είναι δύσκολος ο καθορισμός ενός αποδεκτού ορίου πάνω από το οποίο να μην επιτρέπεται η αύξηση της φόρτισης.
- Τα όρια πιθανόν να ποικίλουν, ανάλογα με την παράμετρο που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση του επιπέδου υγείας και ευζωίας των πτηνών.
- Οι συνθήκες εκτροφής και οι χειριστικές πρακτικές έχουν σημαντική επίδραση στην ευζωία των πτηνών, με αποτέλεσμα πτηνά που εκτρέφονται στην ίδια φόρτιση αλλά σε διαφορετικές συνθήκες να εμφανίζουν διαφορές στο επίπεδο υγείας και ευζωίας.
- Οι απαιτήσεις σε διαθέσιμο χώρο, των διαφορετικών γενοτύπων ορνιθίων που χρησιμοποιούνται, ποικίλουν.
- Δεν υπάρχουν επαρκή επιστημονικά δεδομένα για τον καθορισμό ορίων, ενώ αυτά που ήδη υπάρχουν βασίζονται σε πειραματικές μελέτες, τα αποτελέσματα των οποίων πολλές φορές διαφέρουν από τα αποτελέσματα σε συνθήκες εκτροφής.

Ο αριθμός πτηνών ανά μονάδα διαθέσιμου χώρου διαφέρει από χώρα σε χώρα, ακόμη και από περιοχή σε περιοχή στην ίδια χώρα. Για παράδειγμα, το ανώτατο όριο που προτείνει το National Chicken Council (NCC, 2005) ποικίλει από 6,5 lb/ft<sup>2</sup> για τις ελαφρύσωμες φυλές έως 8,5 lb/ft<sup>2</sup> για τις βαρύσωμες φυλές. Η Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (2002) έχει καθιερώσει το ανώτατο όριο στις 6 lb/ft<sup>2</sup>. Στην ΕΕ η φόρτιση δαπέδου ποικίλει από 30-36 Kg/m<sup>2</sup> στην Ελβετία και τη Σουηδία, 40 Kg/m<sup>2</sup> στο ΗΒ και 45-54 Kg/m<sup>2</sup> στη Δανία (Sorensen και συν., 2000: Sanotra και συν., 2001β).

Η μονάδα μέτρησης και έκφρασης της φόρτισης δαπέδου ποικίλει στη διεθνή βιβλιογραφία. Για πολλά χρόνια, ο όρος φόρτιση δαπέδου περιέγραφε τον αριθμό των πτηνών ανά μονάδα διαθέσιμου χώρου (Rice και Botsford, 1925: Pettit-Riley και Estevez, 2001). Σήμερα, τα κρεοπαραγωγά ορνίθια εκτρέφονται, με στόχο την επίτευξη συγκεκριμένου βάρους κατά τη σφαγή, το οποίο διαφέρει σημαντικά από αυτό των προηγούμενων ετών, αλλά και από χώρα σε χώρα, ανάλογα με τις απαιτήσεις των καταναλωτών. Για αυτόν το λόγο έχει πλέον καθιερωθεί η φόρτιση δαπέδου να εκφράζεται ως βιομάζα ανά μονάδα διαθέσιμου χώρου (Kg/m<sup>2</sup> ή lb/ft<sup>2</sup>) (Thaxton και συν., 2006). Στη διεθνή βιβλιογραφία, η

φόρτιση δαπέδου αναφέρεται, επίσης, ως  $\text{ft}^2$  ή  $\text{cm}^2$  ή  $\text{dm}^2$  ή  $\text{m}^2$  ανά πτηνό, ως αριθμός πτηνών ανά  $\text{m}^2$  και ως βιομάζα ανά μονάδα διαθέσιμου χώρου (Estevez, 2007).

#### **4.2 Επίδραση της φόρτισης δαπέδου στις αποδόσεις**

Η φόρτιση δαπέδου επηρεάζει σημαντικά τις αποδόσεις των κρεοπαραγωγών ορνιθίων και κατά επέκταση τα έσοδα του πτηνοτρόφου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να υπάρχουν πολυάριθμες αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία, ακόμη και από τη δεκαετία του 1940, η πλειονότητα των οποίων αναφέρει ότι η αύξηση της φόρτισης δαπέδου έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του ΣΒ κατά τη σφαγή (ΣΒΣ) (Tomhave και Seeger, 1945: Heishman και συν., 1952: Hansen και Becker, 1960: Proudfoot και συν., 1979).

Η μείωση του ΣΒΣ αποδόθηκε αρχικά στην ανεπάρκεια του διαθέσιμου χώρου και των τροφοδόχων, αλλά οι Hansen και Becker (1960) απέδειξαν ότι παρά τη διατήρηση του ταϊστικού διαστήματος σταθερού, η μείωση του ΣΒΣ δεν αποφεύχθηκε. Τα αποτελέσματα από τις παραπάνω μελέτες δεν έχουν πρακτική εφαρμογή σήμερα, επειδή διεξήχθησαν πριν αρκετά χρόνια, με αποτέλεσμα τόσο οι συνθήκες εκτροφής όσο και το γενετικό υλικό των κρεοπαραγωγών ορνιθίων και κατ' επέκταση οι φυσιολογικές τους ανάγκες να διαφέρουν κατά πολύ από τα σημερινά δεδομένα. Παρόλα αυτά, η αρνητική επίδραση της αυξημένης φόρτισης εκδηλώνεται, ακόμη και όταν ο διαθέσιμος χώρος ανά πτηνό και η ηλικία κατά τη σφαγή είναι κατά πολύ υψηλότερα από τα σημερινά δεδομένα (Estevez, 2007).

Οι Bolton και συν. (1972) δεν παρατήρησαν μεταβολή στο ΣΒΣ των κρεοπαραγωγών ορνιθίων ηλικίας δέκα εβδομάδων, ενώ αντίθετα στη μελέτη των Proudfoot και συν. (1979) φαίνεται ότι η αύξηση της φόρτισης ( $0,037 \text{ m}^2$ ,  $0,055 \text{ m}^2$ ,  $0,074 \text{ m}^2$  και  $0,0927 \text{ m}^2$  /πτηνό) είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του ΣΒΣ, την υποβάθμιση του σφαγίου, την κακή ανάπτυξη του περώματος και τη γραμμική αύξηση του ποσοστού απόρριψης των σφαγίων, λόγω των αλλοιώσεων του στέρνου. Τα αποτελέσματα ήταν εντονότερα, όταν ο διαθέσιμος χώρος ανά πτηνό ήταν μικρότερος από  $0,055 \text{ m}^2$ . Ωστόσο, οι Deaton και συν. (1968), οι Estevez και συν. (1997) και οι Sorensen και συν. (2000) παρατήρησαν μείωση του ΣΒ, όταν ο διαθέσιμος χώρος ανά πτηνό ήταν μικρότερος από  $0,066 \text{ m}^2$ . Οι Pettit-Riley και Estevez (2001) δεν παρατήρησαν μεταβολή του ΣΒ και της μετατρεψιμότητας της τροφής μεταξύ των φορτίσεων  $0,1 \text{ m}^2$  και  $0,05 \text{ m}^2$  /πτηνό (10 και 20 πτηνά / $\text{m}^2$ ), όμως η θνητότητα, λόγω θερμικής καταπόνησης ήταν υψηλότερη, όταν η φόρτιση ήταν μεγαλύτερη από  $0,066 \text{ m}^2$  (15 πτηνά/ $\text{m}^2$ ).

Σύμφωνα με τους Dozier και συν. (2005), η αύξηση της φόρτισης δαπέδου πάνω από τα 30 Kg/m<sup>2</sup> οδήγησε σε αύξηση της συχνότητας εμφάνισης των δερματικών αμυχών και της λοιμώδους ποδοδερματίτιδας, καθώς και σε μείωση του ΣΒ, λόγω της μείωσης της κατανάλωσης τροφής. Η θνητότητα ήταν επίσης σχετικά μεγαλύτερη (7,5% και 3,6%, αντίστοιχα) στις ομάδες με την υψηλή φόρτιση, συγκριτικά με τους μάρτυρες. Σε αυτή τη μελέτη, ο διαθέσιμος χώρος ανά πτηνό ήταν σχετικά μεγάλος (0,106 m<sup>2</sup>/πτηνό). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η διάρκεια του πειραματισμού ήταν 49 ημέρες και η φόρτιση υπολογίστηκε με ΣΒΣ τα 3,2 Kg, συγκριτικά υψηλότερο με άλλες μελέτες, με αποτέλεσμα να είναι δύσκολη η σύγκριση και η εξαγωγή συμπερασμάτων. Σε μελέτες με μικρότερη φόρτιση, οι Dozier και συν. (2006) παρατήρησαν μείωση του ΣΒ κατά 6%, όταν η φόρτιση ήταν πάνω από 35 Kg/m<sup>2</sup> ή 0,052 m<sup>2</sup>/πτηνό.

Η υψηλή φόρτιση δαπέδου οδηγεί σε μείωση των αποδόσεων των πτηνών, χωρίς ωστόσο να έχει πλήρως διαλευκανθεί ο μηχανισμός δράσης, μέσω του οποίου αυτή προκαλείται (Estevez, 2007). Στις μελέτες όπου διερευνήθηκε η επίδραση της φόρτισης δαπέδου στην πρόσληψη της τροφής, παρατηρήθηκε ότι τα πτηνά που εκτρέφονται σε υψηλή φόρτιση καταναλώνουν μικρότερη ποσότητα τροφής (Shanawany, 1988: Dozier και συν., 2005: Han και συν., 2005). Η μείωση της κατανάλωσης τροφής αρχικά αποδόθηκε στη μείωση του διαθέσιμου χώρου και του ταϊστικού διαστήματος (Malone και συν., 1980: Sorensen και συν., 2000: Dozier και συν., 2006).

Τα εμπορικά εκτρεφόμενα ορνίθια αφιερώνουν μόλις το 11% του χρόνου τους ημερησίως για την κατανάλωση τροφής, ενώ στο φυσικό της περιβάλλον η όρνιθα αφιερώνει το 85% του ημερήσιου χρόνου για να καλύψει τις ημερήσιες διατροφικές της ανάγκες (Cornetto και Estevez, 2001). Ωστόσο, δεν υπάρχει αναφορά στη διεθνή βιβλιογραφία για μείωση του χρόνου κατανάλωσης τροφής, σε συνθήκες αυξημένης φόρτισης δαπέδου (Andrews και συν., 1997: Han και συν., 2005: Febrer και συν., 2006), ούτε ότι η διατήρηση του ταϊστικού διαστήματος σταθερού, περιορίζει τις αρνητικές επιπτώσεις της αυξημένης φόρτισης (Hansen και Becker, 1960). Από τα παραπάνω συμπεραίνεται, ότι η επίδραση της αυξημένης φόρτισης δαπέδου στη μείωση των αποδόσεων δεν οφείλεται στη μείωση του ταϊστικού διαστήματος και η προσθήκη επιπρόσθετων τροφοδόχων θα είχε ως αποτέλεσμα την επιδείνωση της κατάστασης, λόγω της επιπλέον μείωσης του διαθέσιμου χώρου (Estevez, 2007).

Η μη μεταβολή της διατροφικής συμπεριφοράς ταυτόχρονα με τη μείωση της επιθετικότητας και της καταναλισκόμενης ποσότητας τροφής, υποδηλώνουν ότι η μείωση των αποδόσεων πιθανόν να οφείλεται στη μειωμένη όρεξη για κατανάλωση τροφής, λόγω της

υποβάθμισης των συνθηκών εκτροφής που προκαλεί η αύξηση της φόρτισης δαπέδου. Ο μηχανισμός αυτός δικαιολογεί, επίσης, τα διαφορετικά αποτελέσματα που παρατηρούνται σε πειράματα, όπου τα πτηνά εκτρέφονται στην ίδια φόρτιση αλλά σε διαφορετικές συνθήκες εκτροφής (Estevez, 2007).

Συμπερασματικά, από τη διεθνή βιβλιογραφία προκύπτει πως όταν ο διαθέσιμος χώρος ανά πτηνό είναι μικρότερος από 0,07 m<sup>2</sup> (14 πτηνά/m<sup>2</sup>), μειώνεται το ΣΒΣ και υποβαθμίζεται η ευζωία των πτηνών και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του σφαγίου (Estevez, 2007).

#### **4.3 Επίδραση της φόρτισης δαπέδου στην ευζωία**

Η αυξημένη φόρτιση δαπέδου, εκτός από τις οικονομικές επιπτώσεις, έχει συσχετιστεί και με την υποβάθμιση της ευζωίας στα εκτρεφόμενα κρεοπαραγωγά ορνίθια (Pesti και Howarth, 1983; Mashaly και συν., 1984; Craig και συν., 1986). Η ολοένα αυξανόμενη πίεση από τις φιλοζωικές οργανώσεις, για την εξασφάλιση της ευζωίας των πτηνών, έχει ως αποτέλεσμα, τα τελευταία χρόνια, να διεξάγονται περισσότερες μελέτες για την επίδραση της αυξημένης φόρτισης δαπέδου στην ευζωία των πτηνών, συγκριτικά με την επίδραση στις αποδόσεις (Estevez, 2007).

Ο όρος ευζωία περιλαμβάνει τα πέντε βασικά στοιχεία «ελευθερίας» (five freedoms), σύμφωνα με τα οποία τα εκτρεφόμενα ζώα θα πρέπει (Γιαννακόπουλος και Τσερβένη-Γούση, 2001; Defra, 2002):

- Να μην πεινούν και να μη διψούν.
- Να μην καταπονούνται, τόσο θερμικά όσο και φυσικά.
- Να μην υποφέρουν από πόνο, τραυματισμό και ασθένεια.
- Να έχουν τη δυνατότητα εκδήλωσης της φυσιολογικής τους συμπεριφοράς.
- Να μην υποβάλλονται σε φόβο και άλλη μορφή καταπόνησης.

Τα ζητήματα για την ευζωία των πτηνών κατέχουν ιδιαίτερη θέση στις προτεραιότητες της ΕΕ για την έρευνα. Επίσης, επηρεάζουν άμεσα την εξέλιξη της πτηνοτροφίας, επειδή θεωρείται ότι κάθε βελτίωση των συνθηκών ευζωίας των πτηνών θα έχει ως αποτέλεσμα τον περιορισμό του κέρδους για τον πτηνοτρόφο (Estevez, 2007). Το ζήτημα της φόρτισης δαπέδου βρίσκεται στο κέντρο αυτής της διαμάχης. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η αύξηση του διαθέσιμου χώρου ανά πτηνό επηρεάζει θετικά την οικονομικότητα της εκτροφής (Proudfoot και συν., 1979; Shanawany, 1988; Puroh και συν., 1995; Feddes και συν., 2002). Από την άλλη πλευρά όμως, εάν η φόρτιση δαπέδου είναι πολύ υψηλή, το επίπεδο υγείας και οι συνθήκες ευζωίας των πτηνών υποβαθμίζονται (Estevez, 2007).



Σύμφωνα με τους Bolton και συν. (1972), οι οποίοι μελέτησαν την επίδραση της φόρτισης δαπέδου στο βάρος των επινεφριδίων και τους Cravener και συν. (1992), οι οποίοι μέτρησαν την αναλογία των ετερόφιλων κυττάρων προς τα λεμφοκύτταρα (E/Λ), η αυξημένη φόρτιση δεν προκαλεί ψυχολογική καταπόνηση στα εκτρεφόμενα ορνίθια, επειδή δεν διαπιστώθηκε μεταβολή των παραπάνω παραμέτρων. Αντίθετα, σύμφωνα με τον Siegel (1960), η αυξημένη φόρτιση δαπέδου προκάλεσε αύξηση του βάρους των επινεφριδίων.

Η αυξημένη φόρτιση δαπέδου προκάλεσε αύξηση της συγκέντρωσης κορτικοστερόνης του πλάσματος (Pesti και Howarth, 1983: Mashaly και συν., 1984: Craig και συν., 1986), ενώ σύμφωνα με τους Thaxton και συν. (2006), δεν παρατηρήθηκε μεταβολή στη συγκέντρωση της κορτικοστερόνης, της γλυκόζης και της χοληστερόλης του ορού του αίματος μεταξύ ορνιθίων που εκτρέφονταν σε φόρτιση  $0,14 \text{ m}^2$  και  $0,052 \text{ m}^2$  /πτηνό, αντίστοιχα ( $20 \text{ Kg/m}^2$  και  $40 \text{ Kg/m}^2$ ).

Οι Dawkins και συν. (2004) και οι Jones και συν. (2005) παρατήρησαν μεταβολή στα επίπεδα κορτικοστερόνης των ορνιθίων που εκτρέφονταν σε αυξημένη φόρτιση, συγκριτικά με τους μάρτυρες. Ωστόσο, η μεταβολή αποδόθηκε κυρίως σε περιβαλλοντικούς παράγοντες και λιγότερο στην αυξημένη φόρτιση. Αντίθετα, οι Heckert και συν. (2002) παρατήρησαν σημαντική μείωση του βάρους του θυλάκου του Fabricious και της αναλογίας του βάρους του θυλάκου προς το ΣΒ με την αύξηση της φόρτισης δαπέδου ( $0,10 \text{ m}^2$  και  $0,05 \text{ m}^2$ /πτηνό), υποδηλώνοντας τη σημαντική επίδραση της φόρτισης δαπέδου στο ανοσοποιητικό σύστημα.

Η σημασία της φόρτισης δαπέδου στην υγεία και την ευζωία των πτηνών αντικατοπτρίζεται και από το γεγονός ότι μαζί με το ποσοστό θνητότητας, αποτελεί τους κύριους δείκτες στους οποίους βασίζεται η εκτίμηση της ευζωίας των πτηνών, σύμφωνα με την ΕΕ (Van Horne και Achterboch, 2008), παρά το γεγονός ότι στη διεθνή βιβλιογραφία συμπεριλαμβάνονται και άλλες παράμετροι, όπως η συμπεριφορά, οι αποδόσεις, η κατάσταση υγείας, η ταχύτητα του ρυθμού ανάπτυξης, η ικανότητα βάρδισης, η εκδήλωση ασκίτη κ.ά. (Γιαννακόπουλος και Τσερβένη-Γούση, 2001: Estevez, 2007).

Η ικανότητα βάρδισης και η χωλότητα αποτελούν σημαντικούς δείκτες για την εκτίμηση της επίδρασης της αυξημένης φόρτισης στην ευζωία των πτηνών (Wang και συν., 1998: Sanotra και συν., 2001β, 2002). Η ικανότητα βάρδισης περιορίζεται σημαντικά με την αύξηση της φόρτισης δαπέδου (Kestin και συν., 1992: Garner και συν., 2002). Συγκεκριμένα, η αναλογία των πτηνών με βαθμό δυσκολίας βάρδισης 4 και 5 (κλίμακα 0-5, Kestin και συν., 1992), το οποίο υποδηλώνει σημαντική δυσχέρεια βάρδισης, είναι σημαντικά υψηλότερη, όταν ο διαθέσιμος χώρος ανά πτηνό είναι ίσος ή μικρότερος από  $0,625 \text{ m}^2$  (Sorensen και συν.,

2000). Πτηνά τα οποία εκτρέφονται σε υψηλή φόρτιση εμφανίζουν υψηλά ποσοστά δερματίτιδας από επαφή στο πέλμα και τα ταρσομετατάρσια (Sorensen και συν., 2000: Arnould και Faure, 2003: Dozier και συν., 2005), επιδεινώνοντας ακόμη περισσότερο τη δυσκολία βάδισης (Sorensen και συν., 2000).

Η επίδραση της αυξημένης φόρτισης δαπέδου στην ικανότητα βάδισης σχετίζεται και με τον περιορισμό της κινητικής δραστηριότητας που παρατηρείται στα κρεοπαραγωγά ορνίθια (Andrews και συν., 1997: Estevez και συν., 1997). Επίσης, η υποβάθμιση της ποιότητας της στρωμνής επηρεάζει σημαντικά την ικανότητα βάδισης (Ekstrand, 1993: Wang και συν., 1998). Σύμφωνα με τους Dozier και συν. (2005), η υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης της λοιμώδους ποδοδερματίτιδας οφείλεται στην αύξηση της υγρασίας της στρωμνής.

Η χονδροδυσπλασία της κνήμης (ΧΔΚ) αποτελεί μία ακόμη παράμετρο, η οποία συμπεριλαμβάνεται στην εκτίμηση των συνθηκών ευζωίας των κρεοπαραγωγών ορνιθίων. Η συχνότητα εμφάνισης της ΧΔΚ δεν φαίνεται να επηρεάζεται από τη φόρτιση δαπέδου, όταν συγκρίνονται χαμηλές και μέτριες φορτίσεις ( $0,1 \text{ m}^2$  και  $0,045 \text{ m}^2$  /πτηνό) (Sorensen και συν., 2000: Tablante και συν., 2003). Αντίθετα, σύμφωνα με τους Sanotra και συν. (2001α), όταν συγκρίνονται υψηλότερες φορτίσεις, η επίδραση της φόρτισης δαπέδου στη συχνότητα εμφάνισης της ΧΔΚ είναι σημαντική. Συγκεκριμένα, το 27% των πτηνών εκδήλωσαν έντονα συμπτώματα ΧΔΚ, όταν η φόρτιση δαπέδου ήταν  $0,033 \text{ m}^2$  /πτηνό ( $30$  πτηνά / $\text{m}^2$ ).

#### **4.4 Επίδραση της φόρτισης δαπέδου στη συμπεριφορά**

Ο όρος «συμπεριφορά» χρησιμοποιείται για να περιγράψει το συγκεκριμένο τρόπο αντίδρασης ή το σύνολο των χαρακτηριστικών ενεργειών των ζώων σε εσωτερικά ή εξωτερικά ερεθίσματα και αποτελεί σημαντικό δείκτη εκτίμησης της ευζωίας των πτηνών. Όσο πλησιέστερες προς τη φυσιολογική συμπεριφορά είναι οι εκδηλώσεις των πτηνών τόσο καλύτερη είναι η ευζωία τους. Η κοινωνική ιεραρχία επηρεάζει τη συμπεριφορά των πτηνών μέσα στο σμήνος, σύμφωνα με την οποία τα πτηνά που βρίσκονται υψηλότερα στην ιεραρχία έχουν προτεραιότητα στην κατανάλωση τροφής και νερού, καθώς και στην ανεύρεση φωλιάς, έναντι άλλων πτηνών που βρίσκονται κατώτερα. Η θέση στην ιεραρχία καθορίζεται με ραμφίσματα μεταξύ των ορνιθίων (Γιαννακόπουλος και Τσερβένη-Γούση, 2001). Η εκτροφή των πτηνών σε αυξημένη φόρτιση δαπέδου συνοδεύτηκε από εκτροπή της συμπεριφοράς από τη φυσιολογική της μορφή, δεδομένου ότι στέρησε τη δυνατότητα στα πτηνά να ικανοποιήσουν τις φυσιολογικές τους ανάγκες (Mtileni και συν., 2007).

Σύμφωνα με τους Febrer και συν. (2006), τα κρεοπαραγωγά ορνίθια αναπτύσσονται μεταξύ τους κοινωνικούς δεσμούς, οι οποίοι διατηρούνται ακόμη και όταν εκτρέφονται σε υψηλή φόρτιση. Ωστόσο, η συχνότητα ενόχλησης, δηλαδή η διακοπή των περιόδων ηρεμίας, από τα άλλα πτηνά αυξάνεται σημαντικά, όταν η φόρτιση δαπέδου είναι υψηλή, τόσο σε πειραματικές συνθήκες (Estevez, 1994: Cornetto και συν., 2002) όσο και σε συνθήκες εκτροφής (Hall, 2001: Febrer και συν., 2006). Οι ενοχλήσεις, παρόλο που δεν σχετίζονται με την επιθετικότητα, μπορούν να προκαλέσουν τραυματισμούς και αμυχές στη ράχη των πτηνών, με αποτέλεσμα την ποιοτική υποβάθμιση των σφαγίων (Proudfoot και συν., 1979: Frankenhuis και συν., 1991: Cravener και συν., 1992: Bilgili και Hess, 1995). Η αυξημένη φόρτιση, εκτός από την επίδραση στην κινητική δραστηριότητα και τις ενοχλήσεις, επηρεάζει και άλλες εκδηλώσεις συμπεριφοράς των πτηνών, όπως τη συχνότητα ανάπαυσης, ραμφίσματος, πρόσληψης τροφής και νερού (Cornetto και Estevez, 2001: Arnould και Faure, 2003: Febrer και συν., 2006).

Η κινητική δραστηριότητα και ο χρόνος βάδισης των πτηνών επηρεάζεται άμεσα από τη φόρτιση δαπέδου (Estevez και συν., 1997: Hall, 2001: Febrer και συν., 2006). Η αύξηση της φόρτισης δαπέδου περιορίζει την κινητική δραστηριότητα, λόγω περιορισμού του διαθέσιμου χώρου ανά πτηνό και σε μικρότερο βαθμό, λόγω κοινωνικών περιορισμών (Newberry και Hall, 1990: Estevez και συν., 1997: Estevez, 2007).

#### **4.5 Επίδραση της φόρτισης δαπέδου σε συνθήκες εκτροφής**

Η ποικιλία των αποτελεσμάτων στις μελέτες που διεξήχθησαν, με στόχο την εκτίμηση της επίδρασης της αυξημένης φόρτισης, οφείλεται στις διαφορετικές πρακτικές διαχείρισης, το γενότυπο των πτηνών που χρησιμοποιήθηκαν, τον τύπο των θαλάμων πειραματισμού, το σύστημα εξαερισμού και θέρμανσης και την εποχή του έτους που διεξήχθησαν οι πειραματισμοί (Sanotra και συν., 2001β: Dawkins και συν., 2004).

Η επίδραση των συνθηκών εκτροφής στην εκδήλωση των δυσμενών επιπτώσεων της αυξημένης φόρτισης έχει αναφερθεί στο παρελθόν (Deaton και συν., 1968), αλλά και πιο πρόσφατα (Weaver και Meijerhof, 1991: Ekstrand και Carpenter, 1998). Το ποσοστό εμφάνισης της λοιμώδους ποδοδερματίτιδας κυμαίνεται από 35,4% έως 75,5%, ανάλογα με την υγρασία της στρωμνής (Ekstrand και συν., 1997).

Οι συνθήκες εκτροφής ασκούν σημαντική επίδραση στην υγεία και την ευζωία των πτηνών, με αποτέλεσμα να είναι δύσκολη αν όχι αδύνατη, η πρόβλεψη της επίδρασης της αυξημένης φόρτισης σε συνθήκες εκτροφής. Για να είναι αξιόπιστες και ρεαλιστικές οι μελέτες που διεξάγονται σε συνθήκες εκτροφής, πρέπει να περιλαμβάνουν μεγάλο αριθμό

πτηνών και οι συνθήκες εκτροφής να είναι όσο το δυνατόν πιο κοντά στις προδιαγραφές που ορίζει η εταιρεία προμήθειας των νεοσσών (Estevez, 2007).

Ιδιαίτερη σημασία πρέπει επίσης να δοθεί και στη χώρα διεξαγωγής των πειραματικών και επιδημιολογικών μελετών, επειδή οι στρατηγικές διαχείρισης και οι συνθήκες εκτροφής διαφέρουν κατά πολύ. Μεγάλη απόκλιση παρατηρείται στα αποτελέσματα των μελετών που διεξάγονται στην Ευρώπη, συγκριτικά με τις μελέτες που διεξάγονται στις ΗΠΑ, λόγω της διαφορετικής σύνθεσης του σιτηρεσίου, των διαφορετικών κτιριακών εγκαταστάσεων και διαχειριστικών πρακτικών που εφαρμόζονται. Αξιοσημείωτο παράδειγμα αποτελεί η διαχείριση της στρωμνής. Η πλειονότητα των πτηνοτρόφων στην Ευρώπη απομακρύνουν τη στρωμή στο τέλος κάθε εκτροφής και την αντικαθιστούν με καινούργια στην επόμενη εκτροφή. Αντίθετα, στις ΗΠΑ η πλειονότητα των πτηνοτρόφων δεν απομακρύνει τη στρωμή στο τέλος κάθε εκτροφής, αλλά τη διατηρεί για 9-12 μήνες, αφαιρώντας απλά την επιφανειακή στοιβάδα που σχηματίζεται και προσθέτοντας μικρή ποσότητα καινούργιας στρωμνής. Οι διαφορές αυτές είναι ύψιστης σημασίας, όσον αφορά την εκτίμηση της επίδρασης της αυξημένης φόρτισης στα πτηνά (Estevez, 2007).

Η ποικιλία των αποτελεσμάτων στις διάφορες μελέτες, για την εκτίμηση της επίδρασης της αυξημένης φόρτισης, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα των μελετών των Dawkins και συν. (2004) και Jones και συν. (2005), υποδηλώνουν ότι η εκδήλωση των αρνητικών επιπτώσεων της αυξημένης φόρτισης είναι το αποτέλεσμα της συνδυασμένης δράσης των συνθηκών εκτροφής και όχι μόνο της αυξημένης φόρτισης. Για αυτόν το λόγο, η προσέγγιση του προβλήματος μεμονωμένα, δηλαδή μόνο της αυξημένης φόρτισης, είναι πολύ απλοϊκή και πιθανόν η ερμηνεία των αποτελεσμάτων και η πρακτική τους εφαρμογή να μην οδηγήσει σε βελτίωση της κατάστασης ή ακόμη και να την επιδεινώσει (Dawkins και συν., 2004).

Ένας πιο ρεαλιστικός και πιθανόν πιο αποτελεσματικός τρόπος αντιμετώπισης των αρνητικών επιπτώσεων της αυξημένης φόρτισης δαπέδου είναι η ταυτόχρονη βελτίωση και προσαρμογή των λοιπών συνθηκών εκτροφής στην εκάστοτε φόρτιση δαπέδου (μέσα σε φυσιολογικά και ρεαλιστικά όρια). Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τον περιορισμό της σχετικής υγρασίας και του επιπέδου αμμωνίας της στρωμνής και τον έλεγχο της διακύμανσης της θερμοκρασίας του θαλάμου στα διάφορα στάδια της εκτροφής (Estevez, 2007).

Η προσέγγιση αυτή έχει το πλεονέκτημα ότι δεν καθορίζει μία άριστη φόρτιση δαπέδου, αλλά αντιμετωπίζει την κάθε εκτροφή ξεχωριστά, δίνοντας τη δυνατότητα στους πτηνοτρόφους να αυξήσουν τη φόρτιση δαπέδου, βελτιώνοντας τις συνθήκες εκτροφής, χωρίς να υποβαθμίζεται η υγεία και η ευζωία των πτηνών. Ωστόσο, οι συνθήκες εκτροφής είναι

δυναμικές και συνεχώς μεταβαλλόμενες, ανάλογα με την ώρα της ημέρας, τις περιβαλλοντικές συνθήκες, την εποχή του έτους κ.ά. Για αυτόν το λόγο, είναι ιδιαίτερα χρήσιμη η εκτίμηση της επίδρασης των συνθηκών εκτροφής, στην υγεία και την ευζωία των πτηνών, π.χ. ελέγχοντας τη συχνότητα εμφάνισης της λοιμώδους ποδοδερματίτιδας στο πτηνοσφαγείο (Estevez, 2007).

Η αυξημένη φόρτιση επηρεάζει σημαντικά και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά της στρωμνής, όπως το pH, την υγρασία, τη θερμοκρασία, τη χημική σύσταση και την μικροχλωρίδα της (Dozier και συν., 2005: 2006: Lovanh και συν., 2007). Η μεταβολή των ποιοτικών χαρακτηριστικών της στρωμνής έχει ως αποτέλεσμα την εκδήλωση παθολογικών καταστάσεων, όπως η λοιμώδης ποδοδερματίτιδα και τα εγκαύματα του ταρσομεταταρσίου. Επίσης, η μεταβολή των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών της στρωμνής ευνοεί τη σπορογονία των κοκκιδίων, με αποτέλεσμα την προδιάθεση στην εκδήλωση της κοκκιδίωσης, η οποία αποτελεί το σημαντικότερο προδιαθεσικό παράγοντα για την εκδήλωση της NE στα κρεοπαραγωγά ορνίθια (Al-Sheikly και Al-Saieg, 1979: Hofacre και συν., 1998: 2003: Jackson και συν., 2003).

## **5. ΘΕΡΜΙΚΗ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ**

### **5.1 Γενικά**

Τα πτηνά χαρακτηρίζονται ως «ομοιόθερμα ή θερμόαιμα», επειδή διαθέτουν αποτελεσματικούς θερμορυθμιστικούς μηχανισμούς με τους οποίους διατηρούν τη θερμοκρασία του σώματός τους μέσα σε σταθερά, στενά όρια σχεδόν ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος (Dawson and Whittow, 2000).

Η ικανότητα αυτή δεν υπήρχε στο πρωτόγονο είδος και πιθανό πρόγονο της σημερινής όρνιθας *Archeopteryx lithographica* και αποκτήθηκε κατά την εξέλιξη των πτηνών, στο μέσο της Κρητιδικής περιόδου. Η υψηλή ταχύτητα του μεταβολικού ρυθμού που χαρακτηρίζει το σύνολο των πτηνών, αποτελεί πιθανόν εξελικτική προσαρμογή των πτηνών που τους έδωσε τη δυνατότητα να διανύουν μεγάλες αποστάσεις για την αναζήτηση τροφής και λιγότερο για να ανταπεξέρχονται στις απαιτήσεις της απλής πτήσης (Ruben, 1996).

Τα διάφορα τμήματα του σώματος μπορεί να έχουν διαφορετική θερμοκρασία, λόγω του διαφορετικού μεταβολικού ρυθμού, της ροής αίματος και της απόστασης από την επιφάνεια. Για παράδειγμα, η θερμοκρασία του εγκεφάλου και του ήπατος είναι υψηλότερη από τη θερμοκρασία του αίματος στην περιφέρεια, με αποτέλεσμα η κυκλοφορία του αίματος στις περιοχές αυτές να συμβάλλει στη μείωση και τον έλεγχο της θερμοκρασίας. Η αντικειμενική θερμοκρασία σώματος στα ορνίθια λαμβάνεται από το απευθυσμένο και κυμαίνεται μεταξύ 41-42 °C (Dawson and Whittow, 2000).

Η θερμότητα παράγεται συνεχώς στον οργανισμό, ως αποτέλεσμα των μεταβολικών εξεργασιών. Εάν δεν υπήρχαν υπεύθυνοι θερμορυθμιστικοί μηχανισμοί για την αποβολή της παραγόμενης θερμότητας, η θερμοκρασία του σώματος θα ανερχόταν σε μη ανεκτά επίπεδα. Η αποβολή της θερμότητας γίνεται είτε μέσω της ακτινοβολίας, της αγωγής και της μεταγωγής είτε μέσω της εξάτμισης νερού από το αναπνευστικό σύστημα και το δέρμα. Η αποβολή της θερμότητας από τον οργανισμό της όρνιθας με την αφόδευση και την αβγοπαραγωγή είναι πολύ περιορισμένη και συμβάλλει ελάχιστα στη θερμορύθμιση (Γιαννακόπουλος και Τσερβένη-Γούση, 2001).

Η θερμότητα που παράγεται στον οργανισμό μπορεί να αποβληθεί με την αύξηση της κυκλοφορίας του αίματος στην περιφέρεια και ιδιαίτερα στο δέρμα, όπου η θερμοκρασία είναι χαμηλότερη από αυτήν του αίματος. Η αποβολή θερμότητας μέσω της ακτινοβολίας, της αγωγής και της μεταγωγής συμβάλλει στην αποβολή του 75% της παραγόμενης θερμότητας (Dawson and Whittow, 2000).

Η κυκλοφορία του αίματος στην περιφέρεια ελέγχεται από το συμπαθητικό νευρικό σύστημα. Η μείωση του μυϊκού τόνου των συμπαθητικών αγγειοσυσταλτικών μυϊκών ινών των αγγείων έχει ως αποτέλεσμα την περιφερική αγγειοδιαστολή και την αυξημένη αποβολή θερμότητας. Το ερέθισμα για τη μείωση του τόνου προέρχεται από τη θερμοκρασία του αίματος του εγκεφάλου. Υπερευαίσθητα κύτταρα που εντοπίζονται στον υποθάλαμο, αντιδρούν στην αύξηση της θερμοκρασίας, με αποτέλεσμα να ενεργοποιούνται φυσιολογικοί μηχανισμοί και να μεταβάλλεται η συμπεριφορά των πτηνών, με στόχο την απώλεια θερμότητας. Επίσης, η μείωση του τόνου μπορεί να οφείλεται και στη διέγερση των θερμοϋποδοχέων που εντοπίζονται στο δέρμα και σε άλλα σημεία του σώματος (Dawson and Whittow, 2000).

Η εξάτμιση του νερού έχει ως αποτέλεσμα την αποβολή θερμότητας και τη μείωση της θερμοκρασίας του σώματος. Η εξάτμιση του νερού στα πτηνά συμβάλλει στην αποβολή του 25% της παραγόμενης θερμότητας και διεξάγεται κυρίως στο αναπνευστικό σύστημα και λιγότερο στο δέρμα, επειδή τα πτηνά δεν διαθέτουν ιδρωτοποιούς αδένες και το πτέρωμα περιορίζει την εξάτμιση (Dawson and Whittow, 2000).

Ο όρος «θερμική καταπόνηση» χρησιμοποιείται για να περιγράψει την αντίδραση των πτηνών στην αύξηση της θερμοκρασίας και της υγρασίας του περιβάλλοντος. Όταν η θερμοκρασία του περιβάλλοντος ή του θαλάμου, είναι υψηλή, τα ορνίθια αναπνέουν με ανοιχτό ράμφος και αυξάνουν τη συχνότητα των αναπνοών έως και 150 /λεπτό. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να διέρχεται περισσότερος αέρας και να εξατμίζεται περισσότερο νερό, συμβάλλοντας στην αποβολή της θερμότητας και στη διατήρηση της θερμοκρασίας στα φυσιολογικά όρια (Ojano-Dirain και Waldroup, 2002).

Εάν η θερμική καταπόνηση των πτηνών έχει μεγάλη ένταση και διάρκεια, τότε οδηγεί σε υποκαπνία και αναπνευστική αλκάλωση, λόγω της ταχύπνοιας που παρατηρείται. Όταν η θερμοκρασία περιβάλλοντος είναι υψηλή, τα ορνίθια μεταβάλλουν τη συμπεριφορά και τη στάση του σώματος, με στόχο τη μείωση της παραγόμενης θερμότητας και την αύξηση της αποβολής της. Συγκεκριμένα, αναζητούν σκιερά και δροσερά μέρη, είναι λιγότερο δραστήρια και έχουν τις πτέρυγες πεσμένες και σε αρκετή απόσταση από το σώμα (Dawson and Whittow, 2000).

Εκτός από τη θερμοκρασία, σημαντική επίδραση στη θερμική καταπόνηση έχει και η σχετική υγρασία, η οποία επηρεάζει τη θερμοκρασία που 'αντιλαμβάνονται' τα πτηνά. Η επίδρασή της είναι σημαντικότερη σε υψηλές θερμοκρασίες, επειδή παρεμποδίζει την εξάτμιση του νερού και κατ' επέκταση την αποβολή θερμότητας. Με την αύξηση της σχετικής υγρασίας, η εκδήλωση της θερμικής καταπόνησης γίνεται σε χαμηλότερη

θερμοκρασία και η έντασή της είναι υψηλότερη. Αντίθετα, η μείωση της σχετικής υγρασίας έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη απώλεια νερού και την αφυδάτωση των πτηνών (Dawson and Whittow, 2000).

## **5.2 Θερμική καταπόνηση των πτηνών**

Η βελτίωση των συνθηκών εκτροφής και η πρόοδος στον τομέα της διατροφής, σε συνδυασμό με την εντατική γενετική επιλογή που ασκήθηκε στα κρεοπαραγωγά ορνίθια οδήγησε στην αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης τους και στη βελτίωση της μετατρεψιμότητας της τροφής. Ωστόσο, τα χαρακτηριστικά αυτά, περιόρισαν σημαντικά τη θερμορυθμιστική ικανότητα των πτηνών, με αποτέλεσμα την αυξημένη ευαισθησία τους στη θερμική καταπόνηση (Ojano-Dirain και Waldroup, 2002).

Η μείωση της ανθεκτικότητας των σύγχρονων γενοτύπων κρεοπαραγωγών ορνιθίων στη θερμική καταπόνηση οφείλεται στο γεγονός ότι η ανάπτυξη του αναπνευστικού και του καρδιαγγειακού συστήματος δεν είναι ανάλογη της υπέρμετρης ανάπτυξης των μυϊκών μαζών (Yahav, 2000). Επίσης, η καταναλισκόμενη ποσότητα τροφής και ο μεταβολικός ρυθμός των σύγχρονων ορνιθίων έχουν αυξηθεί κατά πολύ, με αποτέλεσμα η παραγόμενη θερμότητα να υπερτερεί των δυνατοτήτων των θερμορυθμιστικών μηχανισμών που είναι υπεύθυνοι για την αποβολή της (Teeter, 1994).

Η συστηματική πτηνοτροφία, τις τελευταίες δεκαετίες, επεκτείνεται στις τροπικές και υποτροπικές περιοχές του πλανήτη, ως αποτέλεσμα της αύξησης του πληθυσμού και του εισοδήματος των κατοίκων. Ενδεικτικά, στο Ιράν η συμβολή της συστηματικής πτηνοτροφίας στη διαμόρφωση του ακαθάριστου εισοδήματος είναι πολύ υψηλή, κατέχοντας τη δεύτερη θέση μετά τις επιχειρήσεις πετρελαίου. Επίσης, το χαμηλό εργατικό κόστος και οι φθηνές πρώτες ύλες του σιτηρεσίου, έχουν ωθήσει μεγάλες, πολυεθνικές εταιρείες να μεταφέρουν σημαντικό αριθμό εκτροφών στις περιοχές αυτές (Ojano-Dirain και Waldroup, 2002).

Οι αποδόσεις των πτηνών στις περιοχές αυτές υστερούν, συγκριτικά με τις αποδόσεις των πτηνών στην Ευρώπη και τη Β. Αμερική. Αυτό οφείλεται σε πολλούς και διαφορετικούς παράγοντες, με σημαντικότερο τη θερμική καταπόνηση που υφίστανται τα πτηνά, λόγω των πολύ υψηλών θερμοκρασιών που επικρατούν σε αυτές τις περιοχές καθόλη τη διάρκεια του έτους. Αντίστοιχο πρόβλημα παρατηρείται τους καλοκαιρινούς μήνες και στις πτηνοτροφικές εκμεταλλεύσεις των περιοχών με εύκρατο κλίμα (Ojano-Dirain και Waldroup, 2002: Al-Ghamdi, 2008).

Οι περισσότερες πτηνοτροφικές εκμεταλλεύσεις, για τον περιορισμό της μετάδοσης λοιμωδών νοσημάτων, βρίσκονται πολλές φορές σε απομακρυσμένες περιοχές. Αυτό έχει ως



αποτέλεσμα, το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί κατά τη μεταφορά των πτηνών, από το πτηνοτροφείο στο πτηνοσφαγείο, να είναι μεγάλο. Τα πτηνά, κατά τη μεταφορά και την αναμονή για τη σφαγή τους, είναι εκτεθειμένα σε διάφορους παράγοντες καταπόνησης, όπως η θερμική καταπόνηση, ο συνωστισμός, η στέρηση τροφής και νερού, ο έντονος θόρυβος κ.ά. Η επίδραση των παραγόντων αυτών στα πτηνά μπορεί να προκαλέσει από ψυχολογική καταπόνηση έως θάνατο, ανάλογα με την ένταση και τη διάρκεια εφαρμογής τους (Nicol και Scott, 1990: Mitchell και Kettlewell, 1993: 1998).

Ο συχνότερος και σημαντικότερος από όλους τους παράγοντες καταπόνησης, που υφίστανται τα ορνίθια κατά τη μεταφορά τους στο πτηνοσφαγείο, θεωρείται η θερμική καταπόνηση (Mitchell και συν., 1992: Mitchell και Kettlewell, 1993). Η χαμηλή θερμοκρασία, σε συνδυασμό με την ταχύτητα του αέρα κατά την κίνηση του μεταφορικού μέσου, μπορεί να προκαλέσει καταπόνηση λόγω ψύχους, η οποία σπάνια οδηγεί σε αύξηση της θνητότητας. Αντίθετα, η θερμική καταπόνηση των πτηνών, κατά τη μεταφορά στο πτηνοσφαγείο και την αναμονή κατά τη σφαγή, μπορεί να οδηγήσει σε υψηλή θνητότητα, σε υποβάθμιση της ευζωίας και των ποιοτικών χαρακτηριστικών του σφαγίου (Mitchell και Kettlewell, 1998).

Σε κανονικές συνθήκες περιβάλλοντος, ένα μέσο όχημα μεταφέρει περίπου 6.000 πτηνά μέσου ΣΒ 2 Kg, καθένα από τα οποία παράγει 10-15 Watt θερμότητας και 10,5 g νερού, λόγω εξάτμισης για την αποβολή θερμότητας. Συνολικά, παράγονται 90 KW θερμότητας και 63 Kg νερού, ποσότητες οι οποίες αυξάνουν, ανάλογα με τη θερμοκρασία και την υγρασία του περιβάλλοντος. Η αδυναμία απομάκρυνσης του θερμικού φορτίου του οχήματος μεταφοράς έχει ως αποτέλεσμα τη θερμική καταπόνηση των πτηνών (Mitchell και Kettlewell, 1998).

Θερμική καταπόνηση των πτηνών κατά τη μεταφορά τους έχει παρατηρηθεί ακόμη και σε χαμηλές θερμοκρασίες περιβάλλοντος (Mitchell και συν., 1992: Kettlewell και συν., 1993). Αυτό οφείλεται στη δημιουργία «πυρήνα θερμότητας» στο εσωτερικό του οχήματος μεταφοράς, λόγω της ανεπάρκειας του συστήματος εξαερισμού και της ανομοιόμορφης κατανομής του αέρα. Στον πυρήνα θερμότητας, η θερμοκρασία ανέρχεται στους 30 °C και η σχετική υγρασία ξεπερνά το 80%, με αποτέλεσμα την έντονη θερμική καταπόνηση των πτηνών (Mitchell και Kettlewell, 1998).

### **5.3 Επίδραση της θερμικής καταπόνησης στις αποδόσεις**

Οι δυσμενείς οικονομικές επιπτώσεις της θερμικής καταπόνησης για την συστηματική πτηνοτροφία οφείλονται στην υψηλή θνητότητα (Mashaly και συν., 2004) και την αρνητική

επίδραση που ασκεί στις αποδόσεις των πτηνών (Yalcin και συν., 2001). Τα πτηνά, όταν εκτίθενται σε υψηλή θερμοκρασία, περιορίζουν την κατανάλωση τροφής και επιβραδύνεται ο μεταβολισμός τους (Yalcin και συν., 1997). Αυτό γίνεται αντιληπτό από τη μείωση της συγκέντρωσης της τριωδοθυρονίνης ( $T_3$ ) (Yahav και Plavnik, 1999) και έχει ως στόχο τη μείωση της παραγωγής θερμότητας. Επίσης, η έκθεση των πτηνών σε υψηλές θερμοκρασίες μειώνει την όρεξη για κατανάλωση τροφής (Hurwitz και συν., 1980). Όλα τα παραπάνω έχουν ως αποτέλεσμα την καθυστέρηση στην ανάπτυξη και την αύξηση του ΔΜΤ (Yalcin και συν., 2001; Mashaly και συν., 2004).

Η θερμική καταπόνηση, εκτός από τις αποδόσεις των πτηνών, επηρεάζει και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του σφαγίου, ενισχύοντας ακόμη περισσότερο τις δυσμενείς οικονομικές επιπτώσεις της. Συγκεκριμένα, προκαλεί αυξημένη εναπόθεση λίπους στο σφάγιο (El-Husseiny και Creger, 1980), μείωση της περιεκτικότητας του ορνίθιου κρέατος σε πρωτεΐνες (Tankson και συν., 2001), αύξηση της υπεροξειδωσής των λιπιδίων (Altan και συν., 2003), μείωση του pH και της ικανότητας συγκράτησης ύδατος και αύξηση της συχνότητας εμφάνισης του PSE κρέατος (Feng και συν., 2008).

Η επίδραση που ασκεί η θερμική καταπόνηση στην ποιότητα του σπέρματος και την αβγοπαραγωγή και κατ' επέκταση στη γονιμότητα, ενισχύει ακόμη περισσότερο το δυσμενή της ρόλο στην πτηνοτροφία (Karaca και συν., 2002; Mashaly και συν., 2004). Η ανθεκτικότητα του κελύφους των αυγών μειώνεται κατά τους θερινούς μήνες και οφείλεται στην αύξηση της θερμοκρασίας περιβάλλοντος (Deaton και συν., 1981; Grizzle και συν., 1992). Επιπλέον, η θερμική καταπόνηση των αβγοπαραγωγών ορνίθων έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του ΣΒ (Scott και Balnave, 1988), της αβγοπαραγωγής (Whitehead και συν., 1998), του βάρους του αβγού (Balnave και Muheereza, 1997) και της ποιότητας του κελύφους (Mahmoud και συν., 1996).

Η δυσμενής επίδραση της θερμικής καταπόνησης στα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά της αβγοπαραγωγής οφείλεται στη μείωση της κυκλοφορίας του αίματος στο γεννητικό σύστημα, λόγω της περιφερικής αγγειοδιαστολής (Wolfenson και συν., 1978) και στη μειωμένη συγκέντρωση διοξειδίου του άνθρακα και ασβεστίου στο πλάσμα του αίματος (Koelkebeck και Odom, 1994), λόγω της ταχύπνοιας και της μειωμένης κατανάλωσης τροφής και απορρόφησης θρεπτικών συστατικών από το γαστρεντερικό σωλήνα (Bonnet και συν., 1997). Όλα τα παραπάνω έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση της αβγοπαραγωγής και την αδυναμία σχηματισμού του ανθρακικού ασβεστίου, το οποίο αποτελεί το κύριο συστατικό που προσδίδει την ανθεκτικότητα στο κέλυφος των αυγών (Mashaly και συν., 2004).

Η ποιότητα του σπέρματος επηρεάζεται σημαντικά από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος. Συγκεκριμένα, στα πτηνά που εκτίθενται σε υψηλές θερμοκρασίες παρατηρείται υποβάθμιση της ποιότητας του σπέρματος και μείωση του αριθμού των σπερματοζωαρίων που διαπερνούν την λεκιθική μεμβράνη. Επίσης, ο δείκτης ποιότητας σπέρματος, ο οποίος σχετίζεται με τη γονιμότητα, μειώνεται όταν τα πτηνά εκτίθενται σε υψηλές θερμοκρασίες (Karaca και συν., 2002).

### **5.4 Επίδραση της θερμικής καταπόνησης στην ευζωία**

Η θερμική καταπόνηση υποβαθμίζει σημαντικά την ευζωία των πτηνών (Aksit και συν., 2006). Η έκθεση των πτηνών σε υψηλές θερμοκρασίες έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση 1) της συγκέντρωσης κορτικοστερόνης του ορού του αίματος (Ben Nathan και συν., 1976), 2) της αναλογίας E/A (Oltan και συν., 2003) και 3) της συγκέντρωσης της CK (Hocking και συν., 1994), της LDH (Feng και συν., 2008) και της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (Franco-Jimerez και Beck, 2007). Όλα τα παραπάνω αποτελούν δείκτες για την εκτίμηση της ευζωίας των πτηνών (Siegel, 1980). Επίσης, παρατηρείται αύξηση του αριθμού των βασεόφιλων κυττάρων και μείωση του αιματοκρίτη, λόγω της περιφερικής αγγειοδιαστολής (Mitchell και συν., 1992; Yahav και Hurwitz, 1996).

### **5.5 Επίδραση της θερμικής καταπόνησης στο πεπτικό σύστημα**

Η θερμική καταπόνηση ασκεί άμεση επίδραση στα ανατομικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά του γαστρεντερικού σωλήνα. Συγκεκριμένα, επιβραδύνει το ρυθμό ανανέωσης των εντεροκυττάρων (Lambert και συν., 2002), μειώνει το βάρος του γαστρεντερικού σωλήνα, το μήκος της νήστιδας (Mitchell και Carlisle, 1992) και το ύψος των λαχνών (Garriga και συν., 2006). Οι παραπάνω μεταβολές οφείλονται στη μείωση της καταναλισκόμενης ποσότητας τροφής και της μειωμένης συγκέντρωσης  $T_3$  που παρατηρείται στα πτηνά που εκτίθενται σε υψηλές θερμοκρασίες (Garriga και συν., 2006).

Η σύνθεση της εντερικής μικροχλωρίδας μεταβάλλεται στα πτηνά που υφίστανται θερμική καταπόνηση (Burkholder και συν., 2008). Σύμφωνα με τους Suzuki και συν. (1983), παρατηρείται αύξηση του πληθυσμού των σταφυλόκοκκων, των στρεπτόκοκκων και των κλωστρίδιων του γαστρεντερικού σωλήνα.

Η επίδραση της θερμικής καταπόνησης στα ανατομικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά του γαστρεντερικού σωλήνα και στη σύνθεση της εντερικής μικροχλωρίδας έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του αποικισμού του από παθογόνα βακτήρια και την αυξημένη απέκκρισή τους μέσω των κοπράνων (Bailey, 1988).

## 6. ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ ΛΟΓΩ ΨΥΧΟΥΣ

### 6.1 Γενικά

Το ψύχος προκαλεί έντονη φυσιολογική και ψυχολογική καταπόνηση στα ορνίθια και απαιτείται η κατανάλωση ενέργειας για τη διατήρηση της θερμοκρασίας του σώματος στα φυσιολογικά όρια (Hangalapura, 2006). Συγκεκριμένα, το ψύχος ενεργοποιεί τους θερμορρυθμιστικούς μηχανισμούς, οι οποίοι είτε περιορίζουν την απώλεια θερμότητας είτε αυξάνουν την παραγωγή της. Οι φυσιολογικές αντιδράσεις των πτηνών στο ψύχος διεγείρονται από τη θερμοκρασία του αίματος και τα τοπικά αντανακλαστικά (Dawson and Whittow, 2000).

Όταν τα πτηνά εκτίθενται σε χαμηλές θερμοκρασίες, ανορθώνουν το πτέρωμα, με στόχο να περιορίσουν την απώλεια θερμότητας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να αυξάνεται η ποσότητα θερμού αέρα που εγκλωβίζεται ανάμεσα στο δέρμα και το πτέρωμα. Επίσης, η απώλεια θερμότητας περιορίζεται με την περιφερική αγγειοσύσπαση, κατά την οποία μειώνεται η κυκλοφορία του αίματος στην περιφέρεια. Ακόμη, στον περιορισμό της απώλειας θερμότητας συμβάλλει και το σύστημα της αντίθετης ροής του αίματος των εν τω βάθει αγγείων των κάτω άκρων. Συγκεκριμένα, το φλεβικό αίμα που επιστρέφει από τα κάτω άκρα πορεύεται πολύ κοντά στο αρτηριακό αίμα που κατευθύνεται προς τα κάτω άκρα, με αποτέλεσμα την ανταλλαγή θερμότητας από το θερμό αρτηριακό αίμα στο ψυχρό φλεβικό αίμα (Dawson and Whittow, 2000).

Όταν ο περιορισμός της απώλειας θερμότητας δεν αρκεί για τη διατήρηση της θερμοκρασίας στα φυσιολογικά όρια, ενεργοποιούνται οι θερμορρυθμιστικοί μηχανισμοί παραγωγής θερμότητας. Στα πτηνά, ο κυριότερος μηχανισμός παραγωγής θερμότητας είναι η γενικευμένη, ρυθμική σύσπαση των μυών, το μυϊκό ρίγος. Είναι αποτελεσματικός μηχανισμός παραγωγής θερμότητας, δεδομένου ότι το 30% με 50% της ενέργειας της μυϊκής σύσπασης μετατρέπεται σε θερμότητα. Οι μυς που συμβάλλουν κυρίως στην παραγωγή θερμότητας είναι οι μυς του στέρνου, ενώ σε χαμηλές θερμοκρασίες συμμετέχουν και οι μυς των κάτω άκρων. Ο μεταβολισμός του καστανόχρωμου λιπώδους ιστού, ο οποίος είναι πλούσιος σε μιτοχόνδρια, δεν φαίνεται να συμβάλλει στην παραγωγή θερμότητας στα πτηνά, επειδή η συγκέντρωσή του είναι πολύ περιορισμένη (Dawson and Whittow, 2000).

Παρά το γεγονός ότι η ικανότητα θερμορύθμισης στα πτηνά προέκυψε ανεξάρτητα από εκείνη των θηλαστικών, οι κυριότεροι θερμορρυθμιστικοί μηχανισμοί είναι παρόμοιοι. Ωστόσο, υπάρχουν κάποιες διαφορές όσον αφορά τη λειτουργία των μηχανισμών, οι οποίες

επηρεάζουν τον τρόπο με τον οποίο επιτυγχάνεται η θερμορύθμιση (Dawson and Whittow, 2000).

Η αναλογία της θερμοευαισθησίας του υποθαλάμου και του νωτιαίου μυελού διαφέρει μεταξύ των πτηνών και των θηλαστικών (Simon, 1989). Επίσης, η συμμετοχή θερμορυθμιστικών μηχανισμών, πλην του μυϊκού ρίγους, στη θερμογένεση των πτηνών είναι ελάχιστη ή ακόμη και μηδαμινή (Marsh και Dawson, 1989). Η δράση τους, στα πτηνά, εκδηλώνεται κυρίως το χειμώνα, έτσι ώστε να ανταπεξέλθουν στις χαμηλές θερμοκρασίες, επειδή η θερμική προστασία που παρέχουν οι φωλιές και οι κουρνιάστρες είναι πολύ μικρή. Η χειμερία νάρκη σπάνια παρατηρείται στα πτηνά. Επίσης, μεγάλος αριθμός πτηνών αποφεύγει τις χαμηλές θερμοκρασίες του χειμώνα, με τη μετανάστευση σε άλλες περιοχές, όπου η θερμοκρασία και η διαθεσιμότητα τροφής είναι πιο ευνοϊκές (Dawson και συν., 1983).

Η θερμομονωτική ικανότητα των πτηνών είναι ανάλογη με εκείνη των θηλαστικών. Συγκεκριμένα, τα πτηνά διαθέτουν πτέρωμα, το οποίο εκτός από την πτητική ικανότητα συμβάλλει και στη θερμομόνωσή τους, αντίστοιχα με το τρίχωμα των θηλαστικών. Επιπρόσθετα, η κατανομή του υποδόριου λιπώδους ιστού, η οποία συμβάλλει στη θερμομόνωση, στα πτηνά είναι εντοπισμένη, ενώ στα θηλαστικά είναι διάχυτα κατανεμημένη (Marsh και Dawson, 1989).

Τα πτηνά, σε αντίθεση με τα περισσότερα θηλαστικά, δεν διαθέτουν ιδρωτοποιούς αδένες, με αποτέλεσμα η απώλεια νερού να διενεργείται με διαφορετικό μηχανισμό από ότι στα θηλαστικά. Αντισταθμιστικά, τα πτηνά μπορούν να αποβάλλουν νερό μέσω της εξάτμισης κατά την αναπνοή, ο ρυθμός της οποίας επιταχύνεται σε καταστάσεις θερμικής καταπόνησης (Dawson and Whittow, 2000).

Τέλος, ο διαφορετικός μηχανισμός τοκετού (ωοτοκία και ζωοτοκία) επηρεάζει σημαντικά τους θερμορυθμιστικούς μηχανισμούς. Συγκεκριμένα, η επώαση του αβγού εκτός του σώματος του πτηνού προϋποθέτει την αποτελεσματική λειτουργία των θερμορυθμιστικών μηχανισμών, ακόμη και σε ακραίες καταστάσεις θερμοκρασίας περιβάλλοντος και στέρησης τροφής (Grant, 1982).

### **6.2 Καταπόνηση των πτηνών λόγω ψύχους**

Τα τελευταία 30 χρόνια, οι διασταυρώσεις και η εντατική γενετική επιλογή που εφαρμόστηκε στα κρεοπαραγωγά ορνίθια είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία γενοτύπων με υψηλό ρυθμό αύξησης και ευνοϊκό ΔΜΤ, γεγονός που οδήγησε στην εφαρμογή ακόμα πιο εντατικών μεθόδων εκτροφής (Hangalapura, 2006).

Η εντατική εκτροφή των πτηνών είχε ως αποτέλεσμα την υποβάθμιση της υγείας και της ευζωίας τους. Αυτό έκανε επιτακτική την προσπάθεια ανεύρεσης εναλλακτικών μορφών εκτροφής, λιγότερο εντατικών ή και εκτατικών, στις οποίες τα πτηνά θα βρίσκονται πιο κοντά στις φυσιολογικές τους συνήθειες και δεν θα χρησιμοποιούνται χημειοθεραπευτικές φαρμακευτικές ουσίες (Van Loon και συν., 2004).

Σε τέτοια συστήματα εκτροφής, τα πτηνά είναι εκτεθειμένα σε διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες καταπόνησης, όπως το ψύχος, τη ζέστη και τον άνεμο, αλλά και σε κοινωνικούς παράγοντες καταπόνησης, όπως τον ανταγωνισμό για την τροφή και την εκδήλωση ραμφίσματος (Hangalapura, 2006). Επιπρόσθετα, το περιβάλλον είναι λιγότερο ελεγχόμενο, με αποτέλεσμα τα πτηνά να έρχονται σε επαφή με μεγαλύτερο μολυσματικό φορτίο (Mollenhorst και συν., 2005). Στην αύξηση του μολυσματικού φορτίου, συμβάλλει επίσης και η απαγόρευση χρησιμοποίησης φαρμακευτικών ουσιών (Hong και συν., 2005).

Η καταπόνηση των πτηνών λόγω ψύχους αποτελεί σημαντικό πρόβλημα και για τις εντατικές εκτροφές ορνιθίων των χωρών της Β. Ευρώπης και της Β. Αμερικής, αλλά και των εύκρατων χωρών κατά τους χειμερινούς μήνες. Παρατηρείται κυρίως στα αρχικά στάδια ανάπτυξης των πτηνών, κατά τα οποία οι θερμορυθμιστικοί μηχανισμοί δεν έχουν αναπτυχθεί πλήρως και οι ανάγκες των πτηνών σε θερμότητα είναι υψηλές. Ακόμη, καταπόνηση λόγω ψύχους μπορεί να παρατηρηθεί και σε πτηνά μεγαλύτερης ηλικίας, ιδιαίτερα κατά τη χειμερινή περίοδο, όταν το σύστημα θέρμανσης της εκτροφής δεν μπορεί να ανταπεξέλθει στις πολύ χαμηλές θερμοκρασίες περιβάλλοντος (Hangalapura, 2006).

### **6.3 Επίδραση του ψύχους στην ευζωία**

Η εκτίμηση της επίδρασης του ψύχους στην ευζωία των πτηνών βασίζεται στη συγκέντρωση της κορτικοστερόνης στον ορό του αίματος και τη μέτρηση της αναλογίας E/Λ. Σύμφωνα με τους Hangalapura και συν. (2004 α, β), η καταπόνηση λόγω ψύχους προκαλεί μείωση της συγκέντρωσης κορτικοστερόνης στα κρεοπαραγωγά ορνίθια. Αντίθετα, σύμφωνα με τους Hester και συν. (1996) και τους Shinder και συν. (2002), η συγκέντρωση της κορτικοστερόνης του ορού του αίματος, σε κρεοπαραγωγά ορνίθια και αβγοπαραγωγές όρνιθες που εκτίθενται σε χαμηλές θερμοκρασίες, είναι αυξημένη. Επίσης, η έκθεση αβγοπαραγωγών ορνιθίων σε χαμηλές θερμοκρασίας προκαλεί την αύξηση της αναλογίας E/Λ (Hester και συν., 1996).

### **6.4 Επίδραση του ψύχους στην υγεία**

Οι σύγχρονοι γενότυποι κρεοπαραγωγών ορνιθίων, λόγω της έντονης γενετικής επιλογής που ασκήθηκε, είναι λιγότερο ικανοί να αντεπεξέλθουν στους παράγοντες καταπόνησης και το υψηλό μολυσματικό φορτίο, με αποτέλεσμα όχι μόνο τη μείωση των αποδόσεων, αλλά και την αύξηση του ποσοστού θνητότητας (Hangalapura, 2006).

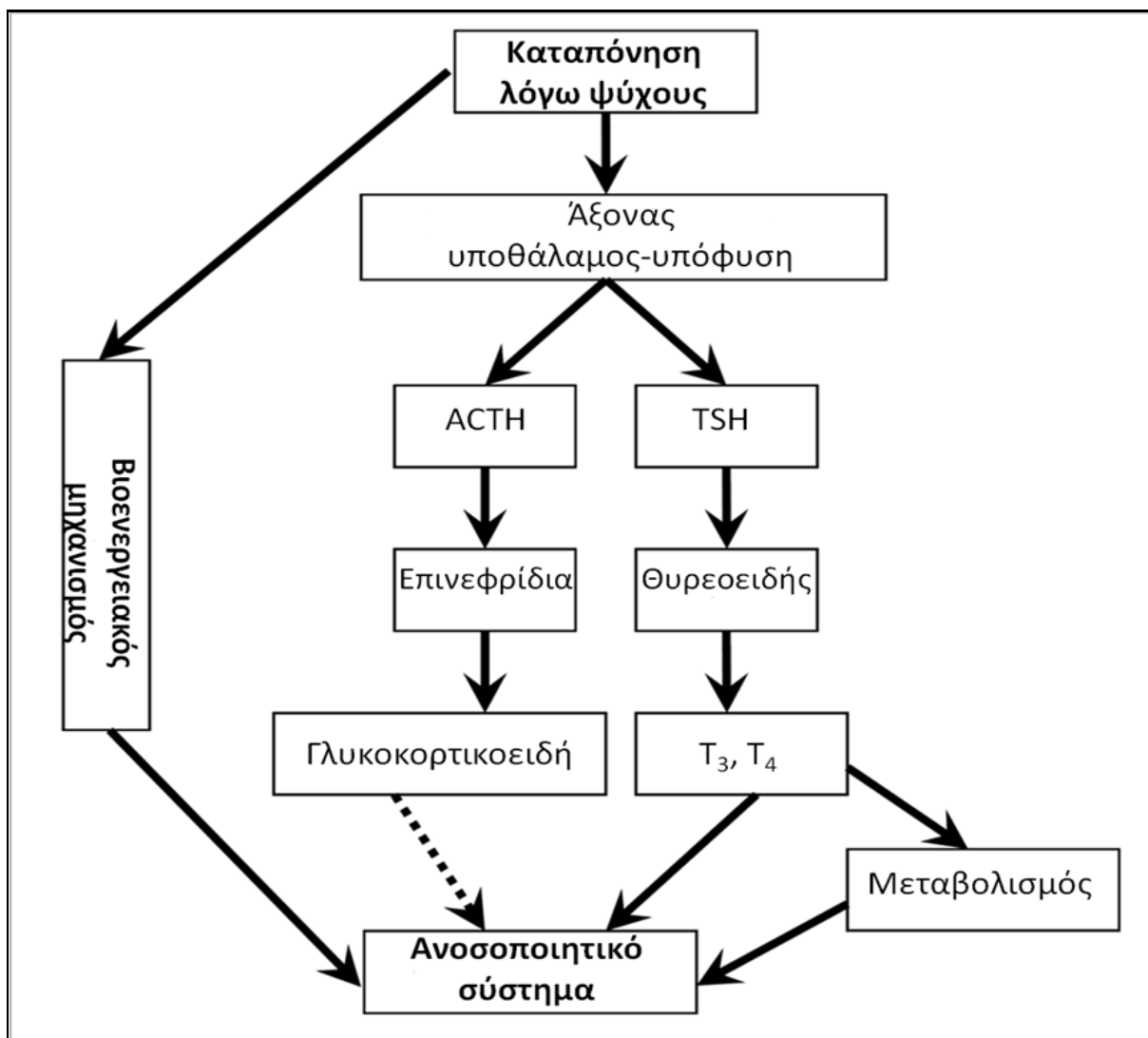
Η έκθεση των σύγχρονων κρεοπαραγωγών ορνιθίων σε χαμηλές θερμοκρασίες προδιαθέτει στην εκδήλωση του συνδρόμου της πνευμονικής υπέρτασης (Wideman και French, 1999: Sato και συν., 2002). Ο υψηλός ρυθμός ανάπτυξης των σύγχρονων γενοτύπων απαιτεί την αυξημένη κατανάλωση ενέργειας, με αποτέλεσμα την επιτάχυνση του μεταβολικού ρυθμού και την αύξηση της απαιτούμενης ποσότητας οξυγόνου. Το ψύχος επιδεινώνει την κατάσταση, αυξάνοντας ακόμη περισσότερο τις ανάγκες σε ενέργεια και οξυγόνο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία των κρεοπαραγωγών ορνιθίων να ανταπεξέλθουν στις αυξημένες ανάγκες και κατά συνέπεια την πρόκληση συστηματικής υποξίας (Julian, 1993).

Η καταπόνηση των πτηνών λόγω ψύχους αυξάνει την ευαισθησία τους σε μολύνσεις από λοιμώδεις παράγοντες. Συγκεκριμένα, για την εκτίμηση της επίδρασης ενός προϊόντος με ανοσοενισχυτική δράση, η έκθεση των πτηνών σε χαμηλή θερμοκρασία πριν την πειραματική μόλυνση με *Escherichia coli*, αποτελούσε απαραίτητη προϋπόθεση, επειδή η μόλυνση από μόνη της δεν ήταν ικανή να προκαλέσει αλλοιώσεις κολοβακτηριακής σηψαιμίας (Huff και συν., 2007).

Το ψύχος είναι από τους σημαντικότερους φυσικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες καταπόνησης και επηρεάζει την υγεία των πτηνών, ιδιαίτερα εκείνων που εκτρέφονται σε μη εντατικές συνθήκες εκτροφής (Hangalapura, 2006).

### **6.5 Επίδραση του ψύχους στο ανοσοποιητικό σύστημα**

Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες καταπόνησης επηρεάζουν τη σοβαρότητα της μόλυνσης από λοιμώδεις παράγοντες στα πτηνά και τα θηλαστικά. Ωστόσο, η επίδρασή τους σε συγκεκριμένους ανοσολογικούς μηχανισμούς παραμένει άγνωστη. Για την ερμηνεία της επίδρασης του ψύχους στο ανοσοποιητικό σύστημα έχουν προταθεί δύο μηχανισμοί, ο βιοενεργειακός και ο ενδοκρινικός (**Εικόνα 6.1.**), χωρίς ωστόσο να είναι τελείως ανεξάρτητοι μεταξύ τους (Hangalapura, 2006).



**Εικόνα 6.1.** Η επίδραση του ψύχους στο ανοσοποιητικό σύστημα (Hangalapura, 2006)

Σύμφωνα με το βιοενεργειακό μηχανισμό, η θερμορύθμιση και η διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος απαιτούν την κατανάλωση ενέργειας (Demas και συν., 1997). Ωστόσο, τα αποθέματα ενέργειας είναι περιορισμένα και κοινά και για τους δύο μηχανισμούς, με αποτέλεσμα η διέγερση του ενός πιθανόν να περιορίζει τη διέγερση του άλλου. Σύμφωνα με τον ενδοκρινικό μηχανισμό, το ψύχος επηρεάζει τη λειτουργία του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια, με συνέπεια τη μεταβολή της συγκέντρωσης των ορμονών που εκκρίνονται (κορτικοστερόνη, θυροξίνη, τριωδοθυρονίνη). Οι ορμόνες αυτές και κυρίως η κορτικοστερόνη, επηρεάζουν άμεσα το ανοσοποιητικό σύστημα, με αποτέλεσμα κάθε μεταβολή της συγκέντρωσής τους να επηρεάζει την αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος στα ερεθίσματα (Madden και Felten, 1995: Hangalapura, 2006).



Τα αποτελέσματα της επίδρασης του ψύχους στο ανοσοποιητικό σύστημα και συγκεκριμένα στους μηχανισμούς της χυμικής και της κυτταρικής ανοσίας ποικίλουν στη διεθνή βιβλιογραφία και σε ορισμένες περιπτώσεις είναι αντιφατικά. Σύμφωνα με τους Hester και συν. (1996), το ψύχος προκαλεί υποβάθμιση της χυμικής ανοσολογικής αντίδρασης σε αβγοπαραγωγές όρνιθες που εκτρέφονται σε ατομικούς κλωβούς, αλλά όχι σε αβγοπαραγωγές όρνιθες που εκτρέφονται ομαδικά. Οι Regnier και συν. (1980) παρατήρησαν ήπια επίδραση του ψύχους στην παραγωγή αντισωμάτων κατά των ερυθρών αιμοσφαιρίων προβάτου (SRBC), τόσο σε αβγοπαραγωγές όρνιθες όσο και σε κρεοπαραγωγά ορνίθια. Οι Dabbert και συν. (1997) δεν παρατήρησαν καταστολή της χυμικής ανοσολογικής αντίδρασης μετά από καταπόνηση λόγω ψύχους σε ορτύκια, παρά την αρνητική επίδραση που άσκησε το ψύχος στη χυμική ανοσολογική αντίδραση σε άγρια πτηνά (*Cyanistes caeruleus*) (Svensson και συν., 1998). Η κυτταρική ανοσολογική αντίδραση αρσενικών ορνιθίων που εκτέθηκαν σε χαμηλή θερμοκρασία υποβαθμίστηκε (Regnier και Kelley, 1981), ενώ σε αναπτυσσόμενες αβγοπαραγωγές όρνιθες το ψύχος διέγειρε την κυτταρική ανοσία (Van Loon και συν., 2004).

Η ποικιλία των αποτελεσμάτων που παρατηρούνται στις παραπάνω επιδημιολογικές και πειραματικές μελέτες αποδίδεται στη διαφορετική διάρκεια καταπόνησης, στο διαφορετικό χρονικό διάστημα μεταξύ της καταπόνησης και της εκτίμησης της ανοσολογικής αντίδρασης, στη διαφορετική παράμετρο της ανοσολογικής αντίδρασης που εκτιμάται, καθώς επίσης στο διαφορετικό είδος και γενετικό υπόβαθρο των πτηνών (Hangalapura, 2006).

## 7. ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ ΜΕ ΑΝΤΙΚΟΚΚΙΔΙΑΚΟ ΕΜΒΟΛΙΟ

### 7.1 Γενικά

Η εντατική γενετική επιλογή που ασκήθηκε στα κρεοπαραγωγά ορνίθια, σε συνδυασμό με την πρόοδο στον τομέα της διατροφής και την εντατικοποίηση των συνθηκών εκτροφής, οδήγησε σε αξιοσημείωτη βελτίωση των αποδόσεών τους. Παράλληλα όμως, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της συχνότητας εμφάνισης παρασιτικών νοσημάτων, όπως είναι η κοκκιδίωση, λόγω της εντατικοποίησης των συνθηκών εκτροφής και της αυξημένης φόρτισης δαπέδου (Lillehoj και Lillehoj, 2000; Lee, 2006).

Η κοκκιδίωση αποτελεί παρασιτικό νόσημα των πτηνών που οφείλεται στη μόλυνση από τα πρωτόζωα του γένους *Eimeria* spp., του φύλου *Apicomplexa* (Levine, 1970). Χαρακτηρίζεται από μείωση των αποδόσεων, κακή μετατρεψιμότητα της τροφής και σπανιότερα από υψηλή θνητότητα (Guzman και συν., 2003). Στις αβγοπαραγωγές όρνιθες που εκτρέφονται σε κλωβοστοιχίες και όχι σε δάπεδο με στρωμή, η σημασία της κοκκιδίωσης είναι περιορισμένη, λόγω αδυναμίας ολοκλήρωσης του βιολογικού κύκλου του παρασίτου. Τα ορνίθια προσβάλλονται κυρίως από 7 είδη κοκκιδίων του γένους *Eimeria* spp. και συγκεκριμένα από τα είδη *E. acervulina*, *E. tenella*, *E. maxima*, *E. brunetti*, *E. necatrix*, *E. mitis* και *E. praecox* (Shirley, 1996; Γεωργοπούλου, 2009). Στα κρεοπαραγωγά ορνίθια, όσον αφορά την παθογένεια και τη συχνότητα εμφάνισης, τα σημαντικότερα είδη κοκκιδίων του γένους *Eimeria* spp. είναι το είδος *E. acervulina*, το είδος *E. maxima* και το είδος *E. tenella* (McDougald και συν., 1997). Στους γεννήτορες παρατηρείται επιπλέον, το είδος *E. brunetti* και το είδος *E. necatrix* (Williams, 1998).

Η κοκκιδίωση έχει χαρακτηριστεί ως το παρασιτικό νόσημα με τον υψηλότερο επιπολασμό (Biggs, 1982) και τις σημαντικότερες οικονομικές επιπτώσεις για τη συστηματική πτηνοτροφία (Lee, 2006). Το 1995, το κόστος της κοκκιδίωσης στο ΗΒ υπολογίστηκε σε £40 εκατομμύρια λίρες Αγγλίας, ενώ παγκοσμίως ξεπερνούσε τα \$800 εκατομμύρια δολάρια (Williams, 1999α). Στις ΗΠΑ, οι απώλειες για τη συστηματική πτηνοτροφία, λόγω της κοκκιδίωσης ανέρχονται σύμφωνα με τους Allen και Fetterer σε \$450 εκατομμύρια (2002), ενώ σύμφωνα με τους Yun και συν. (2000) σε \$1,5 δισεκατομμύρια δολάρια ετησίως. Από την ανάλυση του κόστους της κοκκιδίωσης προκύπτει ότι το 82% οφείλεται στη μείωση των αποδόσεων και την κακή μετατρεψιμότητα της τροφής και το 18% στο κόστος της θεραπευτικής και προληπτικής φαρμακευτικής αγωγής, που εφαρμόζεται στα κρεοπαραγωγά ορνίθια και τους γεννήτορες (Williams, 1999α).

Η διασπορά των κοκκιδίων στο περιβάλλον είναι ευρεία, λόγω της ανθεκτικότητας των ωοκύστεων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, η μόλυνση των εκτροφών να θεωρείται δεδομένη (Williams, 1999β). Η μόλυνση των πτηνών γίνεται, κυρίως, με την κατανάλωση της τροφής και της στρωμνής. Για τη μετάδοση της μόλυνσης έχουν ενοχοποιηθεί η τροφή, το νερό, καθώς επίσης και μεταφορείς, όπως τα τρωκτικά, τα άγρια πτηνά, ακόμη και ο άνθρωπος (Fayer και Reid, 1982).

Η μόλυνση των πτηνών από κοκκίδια μπορεί να εκδηλωθεί με τρεις μορφές: την κλινική κοκκιδίωση, την υποκλινική κοκκιδίωση και την κοκκιδίαση. Η *κλινική* μορφή εκδηλώνεται με υψηλή νοσηρότητα, θνητότητα, διάρροια ή/και αιμορραγικά κόπρανα. Στην *υποκλινική* μορφή της κοκκιδίωσης τα πτηνά δεν εκδηλώνουν κλινικά συμπτώματα, όπως διάρροια και θνητότητα, αλλά συνήθως παρατηρείται καθυστέρηση στην ανάπτυξη και αύξηση του ΔΜΤ. Η *κοκκιδίαση* χαρακτηρίζεται από την απλή παρουσία κοκκιδίων στο γαστρεντερικό σωλήνα, χωρίς όμως να εκδηλώνονται συμπτώματα και να επηρεάζονται οι οικονομικοί δείκτες της εκτροφής (Williams, 1999α: 2005).

### **7.2 Βιολογικός κύκλος *Eimeria* spp.**

Ο βιολογικός κύκλος του *Eimeria* spp. είναι άμεσος και μπορεί να χωριστεί σε τρεις φάσεις: τη *σπορογονία*, τη *μερογονία* (σχιζογονία) και τη *γαμετογονία* (Hammond, 1973). Η έναρξη του βιολογικού κύκλου γίνεται με την εξέλιξη της άωρης ωοκύστης σε ώριμη σποροφόρο ωοκύστη, η οποία αποτελεί και τη μολύνουσα μορφή. Η σπορογονία διεξάγεται στο περιβάλλον και εξαρτάται από τη θερμοκρασία, την υγρασία και την παρουσία οξυγόνου (Kheysin, 1972).

Οι σποροφόρες ωοκύστες, μετά την κατάποσή τους, υφίστανται τη μηχανική δράση των συσπάσεων του μυώδους στομάχου και την επίδραση των ενζύμων πέψης και των χολικών αλάτων, με αποτέλεσμα τη διάσπαση του περιβλήματός τους και την απελευθέρωση των σποροζωιδίων (Current και συν., 1990). Τα σποροζωίδια εισέρχονται στα εντερικά κύτταρα, μεγεθύνονται και εξελίσσονται αρχικά σε τροφοζωίδια και στη συνέχεια σε σχιστά, τα οποία περιέχουν τα μεροζωίδια. Μετά τη ρήξη του τοιχώματος των σχιστών και την απελευθέρωση των μεροζωιδίων στο γαστρεντερικό σωλήνα, ολοκληρώνεται ο πρώτος μονογονικός ή σχιζογονικός κύκλος (Αρτοποιός, 1992).

Τα μεροζωίδια εισέρχονται σε νέα εντερικά κύτταρα, εξελίσσονται σε νέα σχιστά και μεροζωίδια και ολοκληρώνεται και ο δεύτερος κύκλος. Ο αριθμός των σχιζογονικών κύκλων εξαρτάται από το είδος του κοκκιδίου. Από τα μεροζωίδια του τελευταίου σχιζογονικού κύκλου προέρχονται τα μικρογαμετοκύτταρα και τα μακρογαμετοκύτταρα, τα οποία

εξελίσσονται σε μικρογαμέτες και μακρογαμέτες, αντίστοιχα. Με το σχηματισμό των γαμετών αρχίζει ο εγγενής πολλαπλασιασμός των κοκκιδίων, από τον οποίο προκύπτει το ζυγωτό και στη συνέχεια η ωκύστη που αποβάλλεται με τα κόπρανα στο περιβάλλον (Αρτοποιός, 1992).

Το χρονικό διάστημα, που μεσολαβεί από την κατάποση των σποροφόρων ωκύστεων έως την αποβολή των άωρων ωκύστεων με τα κόπρανα, καλείται περίοδος επώασης και αποτελεί χαρακτηριστικό του είδους του κοκκιδίου (Αρτοποιός, 1992).

### **7.3 Πρόληψη κοκκιδίωσης**

Η ανάγκη για την πρόληψη της κοκκιδίωσης έγινε επιτακτική, λόγω των σημαντικών οικονομικών επιπτώσεων, της ευρείας διασποράς των κοκκιδίων και της υψηλής συχνότητας εμφάνισης της υποκλινικής μορφής. Οι κυριότερες μέθοδοι πρόληψης της κοκκιδίωσης στα ορνίθια είναι η προληπτική χορήγηση αντικοκκιδιακών φαρμάκων στο σιτηρέσιο και ο εμβολιασμός (Shirley και συν., 2007). Η εφαρμογή αυστηρών μέτρων βιοασφάλειας και η χρησιμοποίηση απολυμαντικών με ειδική δράση κατά των κοκκιδίων, όπως η αμμωνία και οι φαινόλες, μπορούν να συμβάλλουν ουσιαστικά στη μείωση του παρασιτικού φορτίου και κατ' επέκταση στην πρόληψη της κοκκιδίωσης (Williams, 1997).

#### **7.3.1 Χημειοπροφύλαξη**

Η προληπτική χορήγηση φαρμάκων στο σιτηρέσιο των πτηνών αποτελεί τη συχνότερη μέθοδο πρόληψης της κοκκιδίωσης, η οποία εφαρμόζεται από το 1940 (McDougald, 1982). Τα αντικοκκιδιακά φάρμακα που χρησιμοποιούνται διακρίνονται σε συνθετικά και ιονοφόρα (Charman, 1999).

Τα *συνθετικά αντικοκκιδιακά φάρμακα*, όπως οι σουλφοναμίδες, ανακαλύφθηκαν πρώτα και συνέβαλαν ουσιαστικά στην πρόληψη της κοκκιδίωσης (Levine, 1939) και κατ' επέκταση στην ανάπτυξη της πτηνοτροφίας (Charman, 1999). Ο μηχανισμός δράσης των συνθετικών φαρμάκων ποικίλει, ανάλογα με τη δραστική ουσία που περιέχουν. Σε γενικές γραμμές είναι αποτελεσματικά, ελαχιστοποιώντας την αποβολή ωκύστεων με τα κόπρανα, αλλά συχνά αναπτύσσεται ανθεκτικότητα από τα κοκκίδια (Ryley, 1980).

Τα *ιονοφόρα αντικοκκιδιακά φάρμακα* ανακαλύφθηκαν μετέπειτα, αλλά η προληπτική χορήγησή τους στα σιτηρέσια των κρεοπαραγωγών ορνιθίων έχει πλέον καθιερωθεί (Williams, 1999b). Ο μηχανισμός δράσης των ιονοφόρων αντικοκκιδιακών βασίζεται στην ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με μονοθενή και δισθενή κατιόντα, σχηματίζοντας λιπόφιλα συμπλέγματα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μεταβολή της διαπερατότητας της

κυτταρικής μεμβράνης των κοκκιδίων και την καταστροφή τους, χωρίς ωστόσο να επηρεάζονται τα κύτταρα του ξενιστή (Kitandu και Juranova, 2006). Τα ιονοφόρα αντικοκκιδιακά (κοκκιδιοστατικά) περιορίζουν τον πληθυσμό των κοκκιδίων, επιτρέποντας σε κάποιο βαθμό την εγκατάσταση ανοσίας (Danforth, 1998). Επίσης, τα ιονοφόρα αντικοκκιδιακά φάρμακα, εκτός από την αντικοκκιδιακή δράση, εκδηλώνουν ταυτόχρονα και αντικλωστριδιακή δράση, συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στην πρόληψη της NE (Martel και συν., 2004).

Η προληπτική χορήγηση των αντικοκκιδιακών φαρμάκων στα κρεοπαραγωγά ορνίθια μπορεί να γίνει σε διάφορα προγράμματα, με στόχο την αύξηση της αποτελεσματικότητας και τον περιορισμό της ανάπτυξης ανθεκτικότητας από τα κοκκίδια (McDougald, 2003). Τα προγράμματα με τα οποία χορηγούνται συνήθως τα αντικοκκιδιακά φάρμακα για την πρόληψη της κοκκιδίωσης στα κρεοπαραγωγά ορνίθια είναι:

- Η συνεχής χορήγηση ενός συνθετικού ή ιονοφόρου αντικοκκιδιακού στην έναρξη και την ανάπτυξη, τηρώντας πάντα τους χρόνους αναμονής για την αποφυγή καταλοίπων στο ορνίθιο κρέας (συνεχές πρόγραμμα – straight program).
- Η χορήγηση ενός αντικοκκιδιακού κατά την έναρξη και ενός άλλου κατά την ανάπτυξη, ίδιας ή διαφορετικής κατηγορίας (διπλό πρόγραμμα ή πρόγραμμα εναλλαγής χρησιμοποίησης – shuttle program).
- Η συνεχής χορήγηση ενός συνθετικού ή ιονοφόρου αντικοκκιδιακού στην έναρξη και την ανάπτυξη και η αντικατάστασή του σε τακτά χρονικά διαστήματα από κάποιο άλλο αντικοκκιδιακό φάρμακο ή εμβόλιο (πρόγραμμα εκ περιτροπής χρησιμοποίησης – rotation program).

Η χρησιμοποίηση φαρμακευτικών ουσιών για την πρόληψη της κοκκιδίωσης περιορίζεται ολοένα και περισσότερο, λόγω της ανάπτυξης ανθεκτικότητας από τα κοκκίδια και της μείωσης της αποτελεσματικότητάς τους (Charman και Cherry, 1997). Επίσης, οι ανησυχίες των επιστημόνων για την ύπαρξη καταλοίπων των αντικοκκιδιακών φαρμάκων στο ορνίθιο κρέας (McEnoy, 2001) και η πίεση των καταναλωτικών οργανώσεων για τον περιορισμό της προληπτικής χορήγησης φαρμάκων στα σιτηρέσια των ζώων (Young και Craig, 2001) οδήγησε στην κατάργηση ορισμένων αντικοκκιδιακών και στην πρόταση για αναθεώρηση της χρησιμοποίησης των υπολοίπων το 2012 (Shirley και συν., 2007). Ακόμη, το υψηλό κόστος για την ανεύρεση νέων αντικοκκιδιακών φαρμάκων, το οποίο ανέρχεται σε \$500 εκατομμύρια δολάρια ανά αντικοκκιδιακό φάρμακο (Charman και συν., 2002) και η αυστηρή νομοθεσία που διέπει την έγκρισή τους περιόρισε το ενδιαφέρον των

φαρμακευτικών εταιρειών για την ανεύρεση νέων αντικοκκιδιακών φαρμάκων (Williams, 1998).

### **7.3.2 Εμβολιασμός κατά της κοκκιδίωσης**

Η μείωση της συχνότητας χορήγησης των φαρμακευτικών ουσιών για την πρόληψη της κοκκιδίωσης οδήγησε στην προσπάθεια ανεύρεσης εναλλακτικών μεθόδων πρόληψης, η σημαντικότερη από τις οποίες είναι ο εμβολιασμός. Η στρατηγική πάνω στην οποία στηρίζονται τα εμπορικά διαθέσιμα ζωντανά αντικοκκιδιακά εμβόλια βασίζεται στην παρατήρηση πως όταν τα πτηνά μολύνονται 2-3 φορές συνεχόμενα με μικρό αριθμό κοκκιδίων, αναπτύσσουν ανοσία (Joyner και Norton, 1973; Long και συν., 1986).

Η χρησιμοποίηση των εμβολίων για την πρόληψη της κοκκιδίωσης είναι γνωστή από το 1952 (Edgar και Kings, 1952) και εφαρμόστηκε σε γεννήτορες και σε αβγοπαραγωγές όρνιθες που εκτρέφονταν σε δάπεδο με στρωμή (Williams, 1998). Ωστόσο, η εφαρμογή τους ήταν περιορισμένη, λόγω της πιθανής καθυστέρησης στην ανάπτυξη, της μείωσης της αβγοπαραγωγής και του κενού προστασίας έως την ανάπτυξη προστατευτικής ανοσίας (Danforth, 1998). Η αύξηση της συχνότητας εφαρμογής του αντικοκκιδιακού εμβολιασμού, ως μέτρο πρόληψης κατά της κοκκιδίωσης, ενισχύεται από την ανεύρεση νέων μεθόδων χορήγησης, οι οποίες έδωσαν τη δυνατότητα στα αντικοκκιδιακά εμβόλια να χορηγούνται με ασφάλεια, ακόμη και από την 1<sup>η</sup> ημέρα της ζωής των πτηνών, αυξάνοντας παράλληλα την αποτελεσματικότητά τους (Vermeulen και συν., 2001; Chapman και συν., 2002).

Η ανοσία που αναπτύσσεται μετά την εφαρμογή του ζωντανού αντικοκκιδιακού εμβολίου οφείλεται αρχικά στην εξέλιξη του βιολογικού κύκλου των εμβολιακών ωοκύστεων και στη συνέχεια ενισχύεται και διατηρείται από τις επαναμολύνσεις είτε με εμβολιακές είτε με φυσικές ωοκύστες που ανευρίσκονται στη στρωμή (Williams, 2002). Η ανακύκλωση των ωοκύστεων είναι απαραίτητη για την πλήρη ανάπτυξη της προστατευτικής ανοσίας. Αυτό επιβεβαιώνεται και από το γεγονός, ότι πτηνά που εμβολιάστηκαν και παρέμειναν σε κλωβοστοιχίες ήταν ευαίσθητα στη μόλυνση από κοκκίδια, ενώ αντίθετα τα πτηνά που παρέμειναν σε δάπεδο με στρωμή ήταν ανθεκτικά (Chapman και Cherry, 1997). Επιπλέον, οι επαναλαμβανόμενες μολύνσεις με μικρό αριθμό ωοκύστεων είναι πιο αποτελεσματικές, όσον αφορά την πρόκληση προστατευτικής ανοσολογικής αντίδρασης, συγκριτικά με την εφάπαξ μόλυνση με μεγάλο αριθμό κοκκιδίων (Joyner και Norton, 1973).

Ο εμβολιασμός των πτηνών με ζωντανό αντικοκκιδιακό εμβόλιο έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση ήπιων μακροσκοπικών αλλοιώσεων στο γαστρεντερικό βλεννογόνο, βαθμού 1-2 της πενταβάθμιας κλίμακας των Johnson και Reid (1970), χωρίς ωστόσο να εκδηλώνουν

κλινικά συμπτώματα ή καθυστέρηση στην ανάπτυξη (Williams, 1994). Σύμφωνα με τους Williams και Andrews (2001), οι αλλοιώσεις κοκκιδίωσης παρατηρούνται, από την 5<sup>η</sup> έως την 23<sup>η</sup> ημέρα μετά τον εμβολιασμό, στο 24% των πτηνών και αποδίδονται στις εμβολιακές ωοκύστες και όχι στις φυσικές. Η συχνότητα εμφάνισης και η ένταση των αλλοιώσεων εξαρτώνται από την κατηγορία του ζωντανού εμβολίου, τη μέθοδο χορήγησης και την ηλικία των πτηνών (Williams, 1994).

### **7.3.2.1 Τα αντικοκκιδιακά εμβόλια**

Τα αντικοκκιδιακά εμβόλια, ανάλογα με τον τρόπο παρασκευής τους, διακρίνονται σε 3 μεγάλες κατηγορίες: τα ζωντανά πλήρους λοιμογόνου δύναμης, τα ζωντανά ελαττωμένης λοιμογόνου δύναμης (ΕΛΔ) και τα ζωντανά ανθεκτικά σε αντικοκκιδιακά φάρμακα (Kitandu και Juranova, 2006).

Τα ζωντανά πλήρους λοιμογόνου δύναμης αντικοκκιδιακά εμβόλια περιέχουν μικρό αριθμό ωοκύστεων. Το πλεονέκτημά τους έγκειται στην ταυτόχρονη και ομοιόμορφη μόλυνση όλων των πτηνών με μικρό αριθμό ωοκύστεων όταν χορηγηθούν με τη μορφή γέλης την 1<sup>η</sup> ημέρα της ζωής τους (Kitandu και Juranova, 2006). Τα μειονεκτήματα των εμβολίων αυτής της κατηγορίας συνίστανται στον κίνδυνο εισαγωγής ειδών κοκκιδίων που δεν προϋπήρχαν στην εκτροφή, στην καθυστέρηση της εγκατάστασης της ανοσίας, λόγω του μικρού αριθμού εμβολιακών ωοκύστεων και στη δυσκολία καθορισμού της εμβολιακής δόσης με την ελάχιστη πρόκληση αλλοιώσεων στο γαστρεντερικό βλεννογόνο (Lillehoj και Lillehoj, 2000).

Τα ΕΛΔ αντικοκκιδιακά εμβόλια περιέχουν ωοκύστες ελαττωμένης λοιμογόνου δύναμης. Η μείωση της λοιμογόνου δύναμης των ζωντανών αντικοκκιδιακών εμβολίων μπορεί να προκύψει με ακτινοβολία των ωοκύστεων (Waxler, 1941), με επαναλαμβανόμενες διόδους των ωοκύστεων σε εμβρυοφόρα αυγά (Long, 1965) και με επιλογή των ωοκύστεων με βάση την πρωιμότητα (Jeffers, 1975). Το πλεονέκτημα των ΕΛΔ εμβολίων είναι η ανάπτυξη ανοσίας με τη μικρότερη δυνατή πρόκληση αλλοιώσεων στον εντερικό βλεννογόνο, λόγω της μειωμένης λοιμογόνου δύναμης των εμβολιακών ωοκύστεων (Williams, 1994).

Τα αντικοκκιδιακά ΕΛΔ εμβόλια μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για την αντικατάσταση των αντικοκκιδιακών φαρμάκων στα προγράμματα εκ περιτροπής χρησιμοποίησης, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις όπου έχει παρατηρηθεί ανάπτυξη ανθεκτικότητας από τα κοκκίδια στα αντικοκκιδιακά φάρμακα (Charman, 2000). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η εισαγωγή μεγάλου αριθμού ευαίσθητων εμβολιακών ωοκύστεων κατά τον εμβολιασμό

επιτρέπει την κυριαρχία τους, έναντι των ανθεκτικών φυσικών ωοκύστεων της εκτροφής (Jeffers, 1976). Η κυριαρχία των εμβολιακών ωοκύστεων είναι το αποτέλεσμα της αλληλοδιασταύρωσης των εμβολιακών ωοκύστεων με τις φυσικές και όχι απλά της αντικατάστασης των φυσικών ωοκύστεων (Williams, 2002). Η αλληλοδιασταύρωση των ωοκύστεων, εκτός από την εγκατάσταση της ευαισθησίας στα αντικοκκιδιακά φάρμακα, προκαλεί ταυτόχρονα και μείωση της λοιμογόνου δύναμης των φυσικών ωοκύστεων, επειδή τα χαρακτηριστικά αυτά είναι γενετικά σταθερά και μεταβιβάζονται κατά τη διασταύρωση των ωοκύστεων (Williams, 1999β).

Το κύριο μειονέκτημα των ζωντανών λοιμογόνων και ΕΛΔ αντικοκκιδιακών εμβολίων έγκειται στην αδυναμία χορήγησης αντικοκκιδιακών φαρμάκων, σε περίπτωση εκδήλωσης νοσήματος πριν την εγκατάσταση της προστατευτικής ανοσίας (3-4 εβδομάδες) (Charman, 2000). Για αυτόν το λόγο, το παρασιτικό φορτίο της εκτροφής, πριν την εφαρμογή του ζωντανού αντικοκκιδιακού εμβολίου, πρέπει να είναι ιδιαίτερα χαμηλό. Αυτό επιτυγχάνεται με τη διαχείριση των εκτροφών με βάση το σύστημα «all in - all out», με τη διενέργεια καθαρισμού και απολύμανσης με ειδικά απολυμαντικά και την εφαρμογή υγειονομικού κενού τουλάχιστον 2 εβδομάδων (Charman, 2000). Επιπλέον, επειδή η ανοσία που αναπτύσσουν τα πτηνά είναι ειδική του είδους του κοκκιδίου και η αναπαραγωγική ικανότητα των ΕΛΔ εμβολιακών ωοκύστεων είναι μικρή, τα ΕΛΔ αντικοκκιδιακά εμβόλια πρέπει να περιέχουν όλα τα παθογόνα είδη κοκκιδίων που προσβάλλουν τα πτηνά και ο συνολικός αριθμός των ωοκύστεων να είναι μεγάλος, με αποτέλεσμα το κόστος παραγωγής και διάθεσης του εμπορικού προϊόντος να είναι υψηλό (Dalloul και Lillehoj, 2005).

Η αδυναμία της ταυτόχρονης χορήγησης ζωντανού αντικοκκιδιακού εμβολίου και αντικοκκιδιακών φαρμάκων αντιμετωπίζεται με τη χρησιμοποίηση αντικοκκιδιακών εμβολίων που περιέχουν ωοκύστες ανθεκτικές στα αντικοκκιδιακά φάρμακα (Li και συν., 2005). Τα πλεονεκτήματα των εμβολίων της κατηγορίας αυτής συνίστανται στη μείωση του κινδύνου εκδήλωσης κοκκιδίωσης κατά το χρονικό διάστημα πριν την εγκατάσταση προστατευτικής ανοσίας, στη βελτίωση του ΔΜΤ, στην προστασία από είδη κοκκιδίων που δεν συμπεριλαμβάνονται στο εμβόλιο και στην ταυτόχρονη πρόληψη κατά βακτηριακών νοσημάτων, όπως η ΝΕ, λόγω της ταυτόχρονης αντικλωστριδιακής δράσης των ιονοφόρων αντικοκκιδιακών (Charman και συν., 2002). Ωστόσο, λόγω του διπλού κόστους (εμβόλιο και αντικοκκιδιακά φάρμακα), της πίεσης των καταναλωτικών οργανώσεων και της πιθανής μελλοντικής κατάργησης των αντικοκκιδιακών φαρμάκων, η εφαρμογή τους δεν είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη και αναμένεται να περιοριστεί ακόμη περισσότερο (Williams, 2002).



Πρόσφατα, περιγράφηκε μία νέα κατηγορία αντικοκκιδιακών εμβολίων, τα εμβόλια υπομονάδας, τα οποία έχουν το πλεονέκτημα της διασταυρούμενης ανοσίας μεταξύ των ειδών κοκκιδίων που προσβάλλουν τα ορνίθια (Wallach και συν., 2008). Τα εμβόλια αυτά χορηγούνται ενέσιμα στα πατρογονικά σμήνη. Περιέχουν αντιγόνα από τα γαμετοκύτταρα της *E. maxima* και προκαλούν την παραγωγή αντισωμάτων IgY. Τα αντισώματα, μέσω της μητρικής ανοσίας, μεταφέρονται στους απογόνους και προστατεύουν έναντι όλων των ειδών κοκκιδίων που προσβάλλουν τα ορνίθια καθόλη τη διάρκεια της παραγωγικής τους ζωής (Wallach, 2002). Η προστασία αυτή είναι αποτέλεσμα τόσο της μητρικής ανοσίας, κυρίως έως την ηλικία των 3-4 εβδομάδων, όσο και της διέγερσης του ανοσοποιητικού συστήματος των ίδιων των πτηνών, λόγω της φυσικής τους μόλυνσης με τις ωοκύστες της εκτροφής (Wallach και συν., 2008).

### **7.3.2.2. Μείωση της λοιμογόνου δύναμης των εμβολιακών ωοκύστεων**

Η μείωση της λοιμογόνου δύναμης των ζωντανών αντικοκκιδιακών εμβολίων μπορεί να προκύψει με *ακτινοβόληση των ωοκύστεων* (Waxler, 1941), με *επαναλαμβανόμενες διόδους των ωοκύστεων σε εμβρυοφόρα αυγά* (Long, 1965) και με *επιλογή των ωοκύστεων με βάση την πρωιμότητα* (Jeffers, 1975).

Η μειωμένη λοιμογόνος δύναμη των εμβολιακών ωοκύστεων που έχουν υποστεί ακτινοβόληση με ακτινοβολία γ δεν οφείλεται στη μείωση της λοιμογόνου δύναμης, αλλά κυρίως στην καταστροφή των ζωντανών ωοκύστεων και στη μείωση του αριθμού τους, λόγω της έκθεσης στην ακτινοβολία. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι η ακτινοβόληση σε χαμηλές δόσεις αναστέλλει το σχιζογονικό στάδιο του πολλαπλασιασμού χωρίς να προκαλεί απώλεια της αντιγονικότητας (Jenkins και συν. 1993).

Η *E. tenella* είναι το μοναδικό είδος κοκκιδίου που προσβάλλει τα ορνίθια, το οποίο έχει τη δυνατότητα να ολοκληρώσει το βιολογικό του κύκλο στη χοριο-αλλαντοϊκή μεμβράνη εμβρυοφόρων αυγών (Long, 1965). Ο αριθμός των ωοκύστεων αυξάνεται σημαντικά, μετά από επαναλαμβανόμενες διόδους σε εμβρυοφόρα αυγά, ενώ η λοιμογόνος δύναμη του κοκκιδίου για το έμβryo και το πτηνό μειώνεται (Long, 1972). Η μείωση της λοιμογόνου δύναμης οφείλεται στην αδυναμία παραγωγής των χαρακτηριστικά μεγάλων σχιστών 2<sup>ης</sup> γενιάς (Long, 1973β). Ωστόσο, η μείωση της λοιμογόνου δύναμης δεν αποτελεί γενετικά σταθερό χαρακτηριστικό, με αποτέλεσμα την πιθανή ανάκτηση της λοιμογόνου δύναμης (Shirley και Long, 1990).

Η μείωση της λοιμογόνου δύναμης των αντικοκκιδιακών εμβολίων με επιλογή των ωοκύστεων με βάση την πρωιμότητα αποτελεί τη συχνότερη μέθοδο που εφαρμόζεται για την

παρασκευή αντικοκκιδιακών εμβολίων (Williams, 2002). Όλα τα είδη κοκκιδίων που προσβάλλουν τα ορνίθια μπορούν επιλεγούν με βάση τη μικρή διάρκεια της περιόδου επώασης. Τα κύρια χαρακτηριστικά των ωκύστεων που έχουν επιλεγεί με βάση την πρωιμότητα είναι: α) η μικρότερη διάρκεια του βιολογικού κύκλου και της αναπαραγωγικής ικανότητας, λόγω της μείωσης του αριθμού ή/και της διάρκειας των σχιζογονικών σταδίων, β) η μείωση της λοιμογόνου δύναμης, γ) η διατήρηση της αντιγονικότητας και δ) η γενετική σταθερότητα των χαρακτηριστικών (Shirley και Bedrink, 1997).

### **7.3.2.3 Η σύνθεση των ζωντανών αντικοκκιδιακών εμβολίων**

Ο βιολογικός κύκλος των κοκκιδίων είναι περίπλοκος και περιλαμβάνει ενδοκυτταρικές και εξωκυτταρικές φάσεις, καθώς επίσης εγγενή και αγενή στάδια πολλαπλασιασμού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να είναι εξίσου περίπλοκη και η ανοσία των πτηνών κατά της κοκκιδίωσης, περιλαμβάνοντας τη διέγερση των μηχανισμών της χυμικής και της κυτταρικής ανοσίας, καθώς επίσης της ειδικής και της μη ειδικής ανοσίας (Lillehoj, 1998). Η ανοσία που αναπτύσσει ο ξενιστής είναι ειδική του είδους του κοκκιδίου, με αποτέλεσμα τα ορνίθια να μην προστατεύονται έναντι μόλυνσης με ετερόλογο είδος (Rose, 1973) ή και ετερόλογο στέλεχος, όπως στην περίπτωση της *E. maxima* (Shirley, 1989). Για αυτόν το λόγο, η επιλογή των ειδών και των στελεχών κοκκιδίων που απαρτίζουν τη σύνθεση των ζωντανών αντικοκκιδιακών εμβολίων διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο (Williams, 2002).

Όταν χρησιμοποιούνται ζωντανά αντικοκκιδιακά εμβόλια, τα οποία δεν συμπεριλαμβάνουν είδη κοκκιδίων που υπάρχουν στην εκτροφή, υπάρχει κίνδυνος εκδήλωσης νοσήματος. Το γεγονός αυτό ενισχύει τη σημασία των λιγότερο παθογόνων ή θεωρητικά απαθογόνων ειδών κοκκιδίων, τα οποία συνήθως δεν συμπεριλαμβάνονται στα αντικοκκιδιακά εμβόλια (Charman και συν., 2002).

Ορισμένα είδη κοκκιδίων, όπως το *E. mitis* και το *E. praecox*, έχουν λανθασμένα θεωρηθεί απαθογόνα, με αποτέλεσμα η σημασία τους σε συνθήκες εκτροφής να έχει υποτιμηθεί (Williams, 1998). Το είδος *E. mitis* εμφανίζει παγκόσμια διασπορά (Charman, 1982), ικανοποιητική αντιγονικότητα (Shirley, 1988) και η λοιμογόνος του δύναμη είναι ανάλογη του είδους *E. acervulina* (Shirley και συν., 1983). Με βάση τα παραπάνω, η ενσωμάτωσή του στα ζωντανά αντικοκκιδιακά εμβόλια των κρεοπαραγωγών ορνιθίων κρίνεται απαραίτητη. Παρόλο που η λοιμογόνος δύναμη του *E. praecox* είναι μέτρια (Long, 1968), η αναπαραγωγική του ικανότητα είναι περιορισμένη (Williams, 2002), ενώ η αντιγονικότητά του υπερτερεί του *E. mitis* (Shirley, 1988), με αποτέλεσμα η ενσωμάτωσή του

στα ζωντανά αντικοκκιδιακά εμβόλια των κρεοπαραγωγών ορνιθίων να μην κρίνεται απαραίτητη.

Σε αντίθεση με τη λοιμογόνο δύναμη των κοκκιδίων, η οποία εξαρτάται από εξωγενείς παράγοντες, όπως ο γενότυπος του ορνιθίου (Patterson και συν., 1961) και το σιτηρέσιο (Williams, 1992β), η αντιγονικότητα αποτελεί σταθερό χαρακτηριστικό των κοκκιδίων, με εξαίρεση την περίπτωση του είδους *E. maxima* (Schnitzler και Shirley, 1999). Έχει παρατηρηθεί αξιοσημείωτη αντιγονική ποικιλία του είδους *E. maxima*, μεταξύ στελεχών από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές (Martin και συν., 1997), με αποτέλεσμα να μην υπάρχει διασταυρούμενη προστατευτική ανοσία και τα πτηνά να είναι εκτεθειμένα. Για αυτόν το λόγο, η ενσωμάτωση δύο ή και περισσότερων ετερόλογων στελεχών *E. maxima* στα ζωντανά αντικοκκιδιακά εμβόλια ορνιθίων κρίνεται απαραίτητη.

### **7.4 Σχέση κοκκιδίωσης και εμβολιασμού με άλλα νοσήματα**

Η προσβολή των ορνιθίων από *E. tenella* συμβάλλει στην επιδείνωση των αλλοιώσεων που προκαλεί η μόλυνση από *Histomonas meleagridis* (McDougald και Hu, 2001). Συγκεκριμένα, η μικτή πειραματική μόλυνση των ορνιθίων οδήγησε σε αύξηση του ποσοστού των πτηνών με ηπατικές αλλοιώσεις, συγκριτικά με τη μόλυνση μόνο με το *Histomonas meleagridis*. Ο τραυματισμός του γαστρεντερικού βλεννογόνου, λόγω του πολλαπλασιασμού των κοκκιδίων, ευνοεί επίσης την εγκατάσταση και τον πολλαπλασιασμό παθογόνων βακτηρίων, όπως της *Salmonella typhimurium* (Baba και συν., 1982) και του *C. perfringens* (Helmbolt και συν., 1971).

Ο τραυματισμός του γαστρεντερικού βλεννογόνου έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση έμμορφων και άμορφων συστατικών του αίματος στον αυλό του γαστρεντερικού σωλήνα. Τα συστατικά αυτά και ιδιαίτερα οι πρωτεΐνες του πλάσματος αποτελούν ιδανικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό του *C. perfringens* (Williams και συν., 2003), δεδομένου ότι δεν διαθέτει τους μηχανισμούς για τη σύνθεση 13 απαραίτητων αμινοξέων (Petit και συν., 1999). Επίσης, η μόλυνση των πτηνών με κοκκίδια αυξάνει το χρόνο διαβατότητας του εντερικού περιεχομένου, δίνοντας στα βακτήρια το απαραίτητο χρονικό περιθώριο να αξιοποιήσουν τα θρεπτικά συστατικά του σιτηρεσίου προς όφελός τους, να πολλαπλασιαστούν και να παράγουν τοξίνες (Shane και συν., 1985).

Σύμφωνα με πιο πρόσφατη θεωρία, η κοκκιδίωση προδιαθέτει στην εκδήλωση της ΝΕ, μέσω της πρόκλησης τοπικής Τ-λεμφοκυτταρικής φλεγμονώδους αντίδρασης και της αυξημένης παραγωγής βλέννης από τα καλυκοειδή κύτταρα του γαστρεντερικού βλεννογόνου (Collier και συν., 2008). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μεταβολή της σύστασης της

μικρογλωρίδας του ειλεού και τον πολλαπλασιασμό του *C. perfringens*. Το *C. perfringens* διαθέτει τους κατάλληλους μηχανισμούς, έτσι ώστε να χρησιμοποιεί τη βλέννη ως υπόστρωμα για την ανάπτυξή του και την παραγωγή τοξινών (De Plancke και συν., 2002: Collier και συν., 2003).

Ενδεικτικό της σημασίας της κοκκιδίωσης στην εκδήλωση της NE είναι το γεγονός ότι στα περισσότερα πειραματικά μοντέλα αναπαραγωγής του νοσήματος πριν τη μόλυνση με *C. perfringens* εφαρμόζεται μόλυνση με κοκκίδια (Shane και συν., 1985: Baba και συν., 1992: Branton και συν., 1997) ή με πολλαπλάσια δόση ΕΛΔ αντικοκκιδιακού εμβολίου (Keyburn και συν., 2006: Gholamiandekhordi και συν., 2007: Pedersen και συν., 2008).

Οι αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία, σχετικά με την επίδραση της εφαρμογής του ζωντανού αντικοκκιδιακού εμβολίου στην εκδήλωση της NE, είναι αντιφατικές.

Σε πειραματικές συνθήκες, σε ορνίθια απαλλαγμένα από κοκκίδια, στα οποία χορηγήθηκε το αντικοκκιδιακό εμβόλιο, δεν εκδηλώθηκε NE (Williams, 1994: Waldenstedt και συν., 1999), παρά τη μόλυνση με *C. perfringens*. Οι Williams και συν. (1999β) ανέφεραν ότι κρεοπαραγωγά ορνίθια, τα οποία είχαν εμβολιαστεί με ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο, δεν εκδήλωσαν NE, ενώ αντίθετα πτηνά στα οποία χορηγήθηκαν ιονοφόρα αντικοκκιδιακά φάρμακα και ΑΑΠ εκδήλωσαν NE.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της κλινικής μελέτης των Ernik και Bedrnik (2001), στις εκτροφές κρεοπαραγωγών ορνιθίων στις οποίες ο έλεγχος της κοκκιδίωσης βασιζόταν στην προληπτική χορήγηση αντικοκκιδιακών φαρμάκων δεν εκδηλώθηκαν περιστατικά NE, παρά μόνο όταν εφαρμόστηκε το ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο. Συγκεκριμένα, στην 1<sup>η</sup> και τη 2<sup>η</sup> εκτροφή, κατά τις οποίες χορηγήθηκαν αντικοκκιδιακά φάρμακα, δεν εκδηλώθηκαν περιστατικά NE, σε αντίθεση με την 3<sup>η</sup> και 4<sup>η</sup> εκτροφή, όπου τα αντικοκκιδιακά φάρμακα αντικαταστάθηκαν από το ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο, με αποτέλεσμα την εκδήλωση NE. Στη συνέχεια, στην 5<sup>η</sup> και 6<sup>η</sup> εκτροφή, με την κατάργηση του αντικοκκιδιακού εμβολίου και την επαναφορά των αντικοκκιδιακών φαρμάκων σταμάτησαν και τα περιστατικά NE (Ernik και Bedrnik, 2001).

Επίσης, σύμφωνα με τους Waldenstedt και συν. (1999), πτηνά τα οποία είχαν εμβολιαστεί κατά της κοκκιδίωσης παρουσίαζαν υψηλότερο πληθυσμό *C. perfringens* στα τυφλά και χαμηλότερο ΣΒΣ, συγκριτικά με τα πτηνά στα οποία είχαν χορηγηθεί αντικοκκιδιακά φάρμακα. Τα εμβολιασμένα πτηνά είχαν επίσης υψηλότερο πληθυσμό *C. perfringens* στο γαστρεντερικό σωλήνα και εκδήλωσαν NE. Ωστόσο, δεν έχει διευκρινιστεί αν τα παραπάνω οφείλονταν στον τραυματισμό του γαστρεντερικού

βλεννογόνου από τις εμβολιακές ή τις φυσικές ωκύστες ή στον αποκλεισμό της ταυτόχρονης χορήγησης αντικοκκιδιακών φαρμάκων.

Δεν είναι ακόμη γνωστό, εάν για την εκδήλωση της NE απαιτείται εκτεταμένος τραυματισμός του εντερικού επιθηλίου ή ακόμη και οι ήπιες αλλοιώσεις *per se* είναι ικανές να προδιαθέσουν στην εκδήλωση της NE (Williams, 2002). Οι ήπιες αλλοιώσεις που προκαλούν οι εξασθενημένες ωκύστες πιθανόν να παρέχουν τις κατάλληλες συνθήκες για την εκδήλωση της NE. Επίσης, ένα ακόμη γεγονός πού συνηγορεί στην υπόθεση ότι ο εμβολιασμός κατά της κοκκιδίωσης πιθανόν να συμβάλλει στην εκδήλωση της NE, είναι ότι η εφαρμογή του εμβολιασμού με ζωντανές, εξασθενημένες ωκύστες αποκλείει την ταυτόχρονη χορήγηση ιονοφόρων αντικοκκιδιακών, τα οποία, εκτός της αντικοκκιδιακής δράσης, εμφανίζουν ταυτόχρονα και αντικλωστριδιακή δράση (Williams, 2002: Martel και συν., 2004).

**ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ**

**Η ΔΙΚΗ ΜΑΣ ΕΡΕΥΝΑ**



## **1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **1.1 Πτηνά και εγκαταστάσεις**

Για την εκτίμηση της επίδρασης των παραγόντων καταπόνησης στην παθογένεια της ΝΕ και τις αποδόσεις στα κρεοπαραγωγά ορνίθια χρησιμοποιήθηκαν 1260 νεοσσοί ημέρας Cobb 500, οι οποίοι προμηθεύτηκαν από εμπορικό εκκολαπτήριο (Κουτσός-Τζώτζας Εκκολαπτήρια–Πτηνοτροφία ΑΕΒΕ, E-508). Μετά την παραλαβή, ακολούθησε κλινική εξέταση, ζύγιση και νεκροτομή των νεκρών νεοσσών. Τόσο από τους νεκρούς όσο και από τους ζωντανούς νεοσσούς, διενεργήθηκαν βακτηριολογικές εξετάσεις για τον έλεγχο μόλυνσης από παθογόνα βακτήρια, τα αποτελέσματα των οποίων ήταν αρνητικά.

Οι νεοσσοί κατανεμήθηκαν τυχαία σε ισάριθμες πειραματικές ομάδες και τοποθετήθηκαν σε κλωβούς σε ξεχωριστούς θαλάμους. Οι κλωβοί ήταν μεταλλικοί με πλαστικό δάπεδο, διαστάσεων 110 cm πλάτος επί 200 cm μήκος. Η φόρτιση δαπέδου σε όλες τις πειραματικές ομάδες ήταν 33 Kg βιομάζας ορνιθίων σε ηλικία κατά τη σφαγή/m<sup>2</sup> ή αλλιώς 15 ορνίθια/m<sup>2</sup> (Οδηγία 2007/43/EC), με εξαίρεση στον πειραματισμό της αυξημένης φόρτισης, όπου σε δύο ομάδες η φόρτιση δαπέδου ήταν 30 ορνίθια/m<sup>2</sup>.

Το δάπεδο του κλωβού καλύφθηκε με χαρτόνι, πάνω στο οποίο προστέθηκε η στρωμνή, σε πάχος 10 cm. Ως υλικό στρωμνής χρησιμοποιήθηκε πριονίδι, το οποίο προηγουμένως είχε αποστειρωθεί σε υγρό κλίβανο στους 121 °C για 20 λεπτά (Cyclomotic control, EA605A).

Το σύστημα υδροδότησης περιελάμβανε τέσσερις υδροδόχους τύπου θηλής, με ενσωματωμένο κύπελλο για τον περιορισμό της απώλειας νερού και της διαβροχής της στρωμνής. Η κατανάλωση νερού γινόταν κατά βούληση. Τις πρώτες ημέρες της ζωής των νεοσσών η χορήγηση της τροφής γινόταν σε τρία πλαστικά ταψάκια διαμέτρου 10 cm, τα οποία αντικαταστάθηκαν σταδιακά από πέντε πλαστικές σκαφοειδείς τροφοδόχους, διαστάσεων 30 (μήκος) x 10 (πλάτος) x 6 (ύψος) cm.

Το σύστημα εξαερισμού ήταν αυτόματο και πλήρως ελεγχόμενο. Η λειτουργία του προσαρμοζόταν, ανάλογα με τις ανάγκες των ορνιθίων, όπως ορίζει η εταιρία προμήθειας των νεοσσών (Cobb-Vantress Inc.). Το πρόγραμμα φωτισμού περιελάμβανε 23 ώρες φως και 1 ώρα σκοτάδι, η οποία γινόταν αυτόματα από τις 04:00 π.μ. έως τις 05:00 π.μ.

Η θερμοκρασία των θαλάμων ήταν πλήρως ελεγχόμενη, ρυθμιζόμενη και σύμφωνη με τις οδηγίες της εταιρείας προμήθειας των νεοσσών (Cobb-Vantress Inc.). Συγκεκριμένα, η



θερμοκρασία του θαλάμου την πρώτη ημέρα ήταν 35 °C και μετά την πρώτη εβδομάδα μειωνόταν κατά ένα βαθμό ημερησίως, έτσι ώστε στην ηλικία των 17 ημερών να είναι 25 °C.

Η ρύθμιση της θερμοκρασίας βασιζόταν στη λειτουργία του κλιματιστικού (R 410A Split series, Daikin) και των σωμάτων του συστήματος θέρμανσης. Από την ηλικίας της μίας ημέρας έως εκείνη των δέκα ημερών, επικουρικά των παραπάνω, τοποθετήθηκαν δύο θερμαντικές πηγές (θερμομητέρες) με υπέρυθρους λαμπτήρες παραγωγής θερμότητας (250Watt), σε ύψος 100 cm από το επίπεδο της στρωμνής.

Ο έλεγχος της θερμοκρασίας γινόταν 3 φορές ημερησίως, σύμφωνα με τις ενδείξεις ηλεκτρονικού θερμομέτρου (DT-2, Dende), το οποίο είχε τοποθετηθεί πλευρικά του κλωβού, στο ύψος των ορνιθίων. Η καταγραφή των διακυμάνσεων της θερμοκρασίας γινόταν κάθε 5 λεπτά, σε όλη τη διάρκεια του πειραματισμού, με αυτόματους, ηλεκτρονικούς καταγραφείς (Hobo, onset, Computer Corporation, Bourne, MA).

Στον πειραματισμό για την επίδραση της θερμικής καταπόνησης στην παθογένεια της NE και τις αποδόσεις των κρεοπαραγωγών ορνιθίων, η αύξηση της θερμοκρασίας του θαλάμου στους 35 °C, πραγματοποιήθηκε με τη χρησιμοποίηση της θερμικής λειτουργίας του κλιματιστικού και της αερόθερμης συσκευής παραγωγής θερμότητας (Arcotherm GP 25A), ο έλεγχος της οποίας λειτουργίας γινόταν με ηλεκτρονικό, αυτόματο σύστημα (HP 38 steep-controller).

Στον πειραματισμό για την επίδραση της καταπόνησης λόγω ψύχους στην παθογένεια της NE και τις αποδόσεις των κρεοπαραγωγών ορνιθίων, η μείωση της θερμοκρασίας του θαλάμου στους 15 °C, πραγματοποιήθηκε με τη χρησιμοποίηση της ψυκτικής λειτουργίας του κλιματιστικού και του συστήματος εξαερισμού, ο έλεγχος του οποίου γινόταν με ηλεκτρονικό, αυτόματο σύστημα (HP 38 steep-controller). Η χρησιμοποίηση του συστήματος εξαερισμού έγινε, με στόχο την εκμετάλλευση της χαμηλής θερμοκρασίας του εξωτερικού περιβάλλοντος και την εξοικονόμηση ενέργειας.

Οι θάλαμοι, πριν την τοποθέτηση των ορνιθίων, είχαν καθαριστεί και απολυμανθεί με γενικά (CID 20, VIROCID CID LINES, Ieper, Belgium) και ειδικά (Neopredisan 135-1, Menno Chemie-Vertrieb GmbH, Norderstedt, Germany) απολυμαντικά κατά του *Eimeria* spp. και του *C. perfringens*. Μετά την απολύμανση, εφαρμόστηκε υγειονομικό κενό διάρκειας 2 εβδομάδων. Δύο ημέρες πριν την έναρξη του πειραματισμού, απλώθηκε η στρωμνή, τοποθετήθηκαν οι σάκοι με το φύραμα του κάθε σιτηρεσίου για όλη τη διάρκεια του πειραματισμού και ξεκίνησε η προθέρμανση του θαλάμου.

Σε όλη τη διάρκεια των πειραματισμών, κάθε θάλαμος πειραματισμού είχε αυτόματη λειτουργία, έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος μετάδοσης και μόλυνσης από

παθογόνους παράγοντες. Επίσης, η τοποθέτηση των ομάδων στους θαλάμους και η σειρά επίβλεψής τους, σε όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, προγραμματίστηκε έτσι ώστε η επίβλεψη να γίνεται με κατεύθυνση από τις μη μολυσμένες προς τις μολυσμένες ομάδες.

## **1.2 Σιτηρέσια**

Τα σιτηρέσια των ορνιθίων παρασκευάστηκαν σε εμπορικό παρασκευαστήριο ζωοτροφών (Μ. Στραβαρίδης ΑΒΕΕ). Η διατροφή των ορνιθίων γινόταν κατά βούληση (με εξαίρεση στον πειραματισμό του φυσικού περιορισμού) και περιελάμβανε το σιτηρέσιο έναρξης (Α) από την 1<sup>η</sup> έως την 9<sup>η</sup> ημέρα, το σιτηρέσιο ανάπτυξης (Β) από τη 10<sup>η</sup> έως τη 16<sup>η</sup> ημέρα και το τελικό σιτηρέσιο (Γ) από τη 17<sup>η</sup> έως την 24<sup>η</sup> ημέρα. Η σύνθεση των σιτηρεσίων Α, Β και Γ παρουσιάζεται αναλυτικά στον **Πίνακα 1.1**.

Τα σιτηρέσια ήταν ειδικά προσαρμοσμένα, έτσι ώστε να προδιαθέτουν στην εκδήλωση της ΝΕ. Συγκεκριμένα, περιείχαν μεγάλες ποσότητες σιταριού και σίκαλης, τα οποία λόγω της υψηλής τους περιεκτικότητας σε ΜΣΠ προδιαθέτουν στην εκδήλωση της ΝΕ. Επίσης, στο τελικό σιτηρέσιο, η σόγια αντικαταστάθηκε από το ιχθυάλευρο, το οποίο ευνοεί τον πολλαπλασιασμό του *C. perfringens*. Κανένα σιτηρέσιο δεν περιείχε ΑΑΠ και αντικοκκιδιακά φάρμακα.

Δείγμα νερού από το σύστημα υδροδότησης των θαλάμων αναλύθηκε χημικά και εξετάστηκε μικροβιολογικά. Σε όλα τα σιτηρέσια διενεργήθηκε δειγματοληπτική μακροσκοπική εξέταση, καθώς επίσης και μικροβιολογική ανάλυση. Τα αποτελέσματα των εξετάσεων έδειξαν απουσία παθογόνων παραγόντων και καταλληλότητα προς χρησιμοποίηση.

**Πίνακας 1.1.** Σύνθεση (σε Kg) και χημική σύσταση των σιτηρεσιών

<b>ΣΙΤΗΡΕΣΙΑ</b>			
<b>ΠΡΩΤΕΣ ΥΛΕΣ</b>	<b>A</b> (1-9 ημ.)	<b>B</b> (10-16 ημ.)	<b>Γ</b> (17-24 ημ.)
Σιτάρι	42,82	43,61	43,65
Σίκαλη	7,50	7,50	7,50
Σογιάλευρο	24,57	25,32	0,00
HF σόγιας	10,00	7,50	5,00
Ιχθυάλευρο	0,00	0,00	30,00
Πίτυρα σιταριού	0,00	0,00	5,00
Ζωικό λίπος	9,60	11,29	6,61
Σογιέλαιο	1,50	1,00	1,00
Ανθρακικό ασβέστιο	0,49	0,53	0,00
D-CA-phosphate	1,49	1,32	0,00
Αλάτι	0,30	0,33	0,00
R-φυτάση	0,02	0,02	0,02
Σόδα	0,09	0,00	0,19
L-λυσίνη HCl	0,27	0,24	0,00
DL-μεθειονίνη	0,25	0,23	0,00
L-θρεονίνη	0,09	0,08	0,00
BFW NSP-ένζυμα	0,02	0,03	0,03
Βιταμίνες – ιχνοστοιχεία	1,00	1,00	1,00
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
<b>ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ</b>			
<b>ΤΗΣ ΤΡΟΦΗΣ</b>			
Ολικές πρωτεΐνες (%)	23,65	22,39	31,71
Ολικές λιπαρές ουσίες (%)	12,43	13,63	11,66
Μεταβολιστέα ενέργεια (Kcal/kg)	3311	3394	3402

### **1.3 Πειραματικός σχεδιασμός**

Συνολικά σε όλη τη διάρκεια του πειραματικού μέρους της διδακτορικής διατριβής διεξήχθησαν 5 πειραματισμοί. Σε κάθε έναν από τους 4 πειραματισμούς χρησιμοποιήθηκαν 240 νεοσσοί ημέρας, οι οποίοι τοποθετήθηκαν τυχαία σε 4 ομάδες των 60 ορνιθίων, με δύο επαναλήψεις για κάθε πειραματική ομάδα. Στον πέμπτο πειραματισμό, που αφορούσε στην εκτίμηση του εμβολιασμού με ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο, χρησιμοποιήθηκαν 300 νεοσσοί ημέρας οι οποίοι τοποθετήθηκαν τυχαία σε 5 ομάδες των 60 ορνιθίων, με δύο επαναλήψεις για κάθε πειραματική ομάδα. Η διάρκεια του κάθε πειραματισμού ήταν 24 ημέρες. Σε κάθε ομάδα διεξήχθησαν 5 χρονικές δειγματοληψίες, με 12 ορνίθια ανά δειγματοληψία τη 16<sup>η</sup> ημέρα, την 21<sup>η</sup>, την 22<sup>η</sup>, την 23<sup>η</sup> και την 24<sup>η</sup> ημέρα του πειραματισμού. Τα ορνίθια θανατώθηκαν με τη χρησιμοποίηση διοξειδίου άνθρακα, νεκροτομήθηκαν και στη συνέχεια διεξήχθησαν οι προγραμματισμένες εξετάσεις.

#### **1.3.1 Πειραματικός σχεδιασμός φυσικού περιορισμού διατροφής**

Στόχος του πειραματισμού ήταν η εκτίμηση της επίδρασης του φυσικού περιορισμού της διατροφής στην παθογένεια της NE και τις αποδόσεις των κρεοπαραγωγών ορνιθίων. Ο πειραματικός σχεδιασμός περιελάμβανε την τυχαία κατανομή των νεοσσών σε 4 ομάδες των 60 ορνιθίων. Οι πειραματικοί χειρισμοί που διενεργήθηκαν ήταν η μόλυνση των ορνιθίων με *C. perfringens* και *Eimeria* spp. και ο φυσικός περιορισμός της διατροφής τους.

Δύο ομάδες ορνιθίων μολύνθηκαν από την ηλικία των 17 ημερών με *C. perfringens* τρεις φορές ημερησίως για τέσσερις συνεχόμενες ημέρες και με *Eimeria* spp. εφάπαξ στην ηλικία των 18 ημερών. Σε δύο ομάδες εφαρμόστηκε φυσικός περιορισμός της διατροφής από τη 16<sup>η</sup> έως τη 19<sup>η</sup> ημέρα για 12 ώρες ημερησίως (από 21:00 έως 9:00), με την απομάκρυνση των τροφοδόχων εκτός κλωβού. Στην ομάδα όπου εφαρμόστηκε φυσικός περιορισμός της διατροφής και μόλυνση, ο γαστρεντερικός σωλήνας των ορνιθίων κατά την πρωινή μόλυνση ήταν κενός, λόγω της στέρησης της τροφής που εφαρμοζόταν το προηγούμενο βράδυ. Συγκεκριμένα, οι πειραματικές ομάδες ήταν οι εξής 4:

- Η ομάδα **N**, τα ορνίθια της οποίας χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες, χωρίς να μολυνθούν και να υποστούν φυσικό περιορισμό της διατροφής.
- Η ομάδα **SN**, στα ορνίθια της οποίας εφαρμόστηκε φυσικός περιορισμός της διατροφής από 21:00 έως 9:00 τη 16<sup>η</sup>, τη 17<sup>η</sup>, τη 18<sup>η</sup> και τη 19<sup>η</sup> ημέρα της ζωής των ορνιθίων.

- Η ομάδα **P**, τα ορνίθια της οποίας μολύνθηκαν με *C. perfringens* 3 φορές ημερησίως (στις 09:00, στις 13:00 και στις 17:00) για τέσσερις συνεχόμενες ημέρες, τη 17<sup>η</sup>, τη 18<sup>η</sup>, τη 19<sup>η</sup> και την 20<sup>η</sup> και με *Eimeria* spp. τη 18<sup>η</sup> ημέρα της ζωής των ορνιθίων.
- Η ομάδα **SP**, στα ορνίθια της οποίας εφαρμόστηκε φυσικός περιορισμός της διατροφής από τις 21:00 έως 9:00 τη 16<sup>η</sup>, τη 17<sup>η</sup>, τη 18<sup>η</sup> και τη 19<sup>η</sup> ημέρα και μολύνθηκαν με *C. perfringens* 3 φορές ημερησίως (στις 09:00, στις 13:00 και στις 17:00) για τέσσερις συνεχόμενες ημέρες, τη 17<sup>η</sup>, τη 18<sup>η</sup>, τη 19<sup>η</sup> και την 20<sup>η</sup> και με *Eimeria* spp. τη 18<sup>η</sup> ημέρα της ζωής των ορνιθίων.

### 1.3.2 Πειραματικός σχεδιασμός αυξημένης φόρτισης δαπέδου

Στόχος του πειραματισμού ήταν η εκτίμηση της επίδρασης της αυξημένης φόρτισης δαπέδου στην παθογένεια της NE και τις αποδόσεις των κρεοπαραγωγών ορνιθίων. Ο πειραματικός σχεδιασμός περιελάμβανε την τυχαία κατανομή των νεοσσών σε 4 ομάδες των 60 ορνιθίων. Οι πειραματικοί χειρισμοί που διενεργήθηκαν ήταν η μόλυνση των ορνιθίων με *C. perfringens* και *Eimeria* spp. και η αύξηση της φόρτισης δαπέδου.

Ως φυσιολογική φόρτιση δαπέδου, σύμφωνα με τις προδιαγραφές της εταιρείας προμήθειας των νεοσσών (Cobb-Vantress Inc.) και την Οδηγία 2007/43/EC της ΕΕ, ορίστηκαν τα 33 Kg/m<sup>2</sup> (15 ορνίθια/m<sup>2</sup> ή 1 ορνίθιο/666 cm<sup>2</sup>), με προσδοκώμενο βάρος κατά τη σφαγή στις 42 ημέρες τα 2,2 Kg. Ωστόσο, επειδή η διάρκεια του πειραματισμού ήταν μόνο 24 ημέρες, η φόρτιση δαπέδου εκφράζεται καλύτερα με τον αριθμό των ορνιθίων ανά m<sup>2</sup> διαθέσιμου χώρου ή ως cm<sup>2</sup> διαθέσιμου χώρου ανά ορνίθιο. Στις ομάδες όπου περιορίστηκε ο διαθέσιμος χώρος κατά 50%, η φόρτιση δαπέδου ήταν 30 ορνίθια/m<sup>2</sup> (1 ορνίθιο/333 cm<sup>2</sup>).

Ο περιορισμός του διαθέσιμου χώρου έγινε με την τοποθέτηση κάθετου μεταλλικού διαχωριστικού πλέγματος, διαστάσεων 100x50 cm, στη μέση του κλωβού, από την 1<sup>η</sup> ημέρα της ζωής των ορνιθίων. Ο περιορισμός του χώρου συνοδεύτηκε από ανάλογη μείωση του αριθμού των τροφοδόχων και των υδροδόχων. Σε κάθε χρονική δειγματοληψία γινόταν ανάλογη μείωση του διαθέσιμου χώρου και των σκευών, έτσι ώστε να διατηρηθεί σταθερή η αναλογία των ορνιθίων ανά m<sup>2</sup>. Συγκεκριμένα, οι ομάδες του πειραματισμού ήταν οι εξής 4:

- Η ομάδα **N**, τα ορνίθια της οποίας χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες, με φυσιολογική φόρτιση δαπέδου (33 Kg/m<sup>2</sup> ή 15 ορνίθια/m<sup>2</sup> ή 1 ορνίθιο/666 cm<sup>2</sup>) χωρίς να μολυνθούν.
- Η ομάδα **DN**, στα ορνίθια της οποίας ο διαθέσιμος χώρος περιορίστηκε κατά 50%, από την 1<sup>η</sup> ημέρα της ζωής τους (φόρτιση δαπέδου 30 ορνίθια/m<sup>2</sup> ή 1 ορνίθιο/333 cm<sup>2</sup>).

- Η ομάδα **P**, τα ορνίθια της οποίας εκτρέφονταν σε φυσιολογική φόρτιση δαπέδου και μολύνθηκαν με *C. perfringens* 3 φορές ημερησίως (στις 09:00, στις 13:00 και στις 17:00) για τέσσερις συνεχόμενες ημέρες, τη 17<sup>η</sup>, τη 18<sup>η</sup>, τη 19<sup>η</sup> και την 20<sup>η</sup> και με *Eimeria* spp. τη 18<sup>η</sup> ημέρα της ζωής των ορνιθίων.
- Η ομάδα **DP**, στα ορνίθια της οποίας ο διαθέσιμος χώρος περιορίστηκε κατά 50%, από την 1<sup>η</sup> ημέρα της ζωής τους και μολύνθηκαν με *C. perfringens* 3 φορές ημερησίως (στις 09:00, στις 13:00 και στις 17:00) για τέσσερις συνεχόμενες ημέρες, τη 17<sup>η</sup>, τη 18<sup>η</sup>, τη 19<sup>η</sup> και την 20<sup>η</sup> και με *Eimeria* spp. τη 18<sup>η</sup> ημέρα της ζωής των ορνιθίων.

### **1.3.3 Πειραματικός σχεδιασμός θερμικής καταπόνησης**

Στόχος του πειραματισμού ήταν η εκτίμηση της θερμικής καταπόνησης στην παθογένεια της NE και τις αποδόσεις των κρεοπαραγωγών ορνιθίων. Ο πειραματικός σχεδιασμός περιελάμβανε την τυχαία κατανομή των νεοσσών σε 4 ομάδες των 60 ορνιθίων. Οι πειραματικοί χειρισμοί που διενεργήθηκαν ήταν η μόλυνση των ορνιθίων με *C. perfringens* και *Eimeria* spp. και η αύξηση της θερμοκρασίας του θαλάμου.

Ως φυσιολογική θερμοκρασία για τα κρεοπαραγωγά ορνίθια ηλικίας 17-20 ημερών, σύμφωνα με τις προδιαγραφές της εταιρείας προμήθειας των νεοσσών (Cobb-Vantress Inc.), ορίστηκε η θερμοκρασία των 25 °C. Η θερμοκρασία του θαλάμου σε δύο ομάδες, μία μολυσμένη και μία μη μολυσμένη, αυξήθηκε απότομα και κυκλικά, από τη 16<sup>η</sup> ημέρα έως την 20<sup>η</sup> ημέρα, για 12 ώρες ημερησίως, από τις 21:00 έως τις 09:00, κατά 10 °C, φθάνοντας τους 35 °C. Μετά το πέρας της θερμικής καταπόνησης, η θερμοκρασία επανερχόταν στα φυσιολογικά επίπεδα σε μικρό χρονικό διάστημα (10'-20'). Στις υπόλοιπες δύο ομάδες του πειραματισμού, μία μολυσμένη και μία μη μολυσμένη, η θερμοκρασία παρέμενε σταθερή στους 25 °C. Η σχετική υγρασία δεν ήταν απόλυτα ελεγχόμενη, ωστόσο η διακύμανσή της στο διάστημα της αύξησης της θερμοκρασίας ήταν 40% με 50% και στο διάστημα της φυσιολογικής θερμοκρασίας 30% με 40%. Συγκεκριμένα, οι ομάδες του πειραματισμού ήταν οι εξής 4:

- Η ομάδα **N**, στην οποία τα ορνίθια χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες χωρίς να μολυνθούν, με φυσιολογική θερμοκρασία θαλάμου.
- Η ομάδα **HN**, στην οποία η θερμοκρασία θαλάμου αυξήθηκε κατά 10 °C, φθάνοντας τους 35 °C, από τη 16<sup>η</sup> ημέρα έως την 20<sup>η</sup> ημέρα, για 12 ώρες ημερησίως, από τις 21:00 έως τις 09:00.

- Η ομάδα **P**, στην οποία τα ορνίθια εκτρέφονταν σε φυσιολογική θερμοκρασία θαλάμου και μολύνθηκαν με *C. perfringens* 3 φορές ημερησίως (στις 09:00, στις 13:00 και στις 17:00) για τέσσερις συνεχόμενες ημέρες, τη 17<sup>η</sup>, τη 18<sup>η</sup>, τη 19<sup>η</sup> και την 20<sup>η</sup> και με *Eimeria* spp. τη 18<sup>η</sup> ημέρα της ζωής των ορνιθίων.
- Η ομάδα **HP**, στην οποία η θερμοκρασία θαλάμου αυξήθηκε κατά 10 °C, από τη 16<sup>η</sup> ημέρα έως την 20<sup>η</sup> ημέρα για 12 ώρες ημερησίως και τα ορνίθια μολύνθηκαν με *C. perfringens* 3 φορές ημερησίως (στις 09:00, στις 13:00 και στις 17:00) για τέσσερις συνεχόμενες ημέρες, τη 17<sup>η</sup>, τη 18<sup>η</sup>, τη 19<sup>η</sup> και την 20<sup>η</sup> και με *Eimeria* spp. τη 18<sup>η</sup> ημέρα της ζωής των ορνιθίων.

### 1.3.4 Πειραματικός σχεδιασμός καταπόνησης λόγω ψύχους

Στόχος του πειραματισμού ήταν η εκτίμηση της καταπόνησης λόγω ψύχους στην παθογένεια της NE και τις αποδόσεις των κρεοπαραγωγών ορνιθίων. Ο πειραματικός σχεδιασμός περιελάμβανε την τυχαία κατανομή και τοποθέτηση των νεοσσών σε 4 ομάδες των 60 ορνιθίων. Οι πειραματικοί χειρισμοί που διενεργήθηκαν ήταν η μόλυνση των ορνιθίων με *C. perfringens* και *Eimeria* spp. και η μείωση της θερμοκρασίας του θαλάμου.

Σύμφωνα με τις προδιαγραφές της εταιρείας προμήθειας των νεοσσών, η φυσιολογική θερμοκρασία για τα κρεοπαραγωγά ορνίθια ηλικίας 17-20 ημερών ορίστηκε στους 25 °C (Cobb-Vantress Inc.). Η θερμοκρασία του θαλάμου σε δύο ομάδες, μία μολυσμένη και μία μη μολυσμένη, μειώθηκε απότομα και κυκλικά από τη 17<sup>η</sup> ημέρα έως την 20<sup>η</sup> ημέρα για 12 ώρες ημερησίως, από τις 09:00 έως τις 21:00, κατά 10 °C, φθάνοντας τους 15 °C. Μετά το πέρας της θερμικής καταπόνησης, η θερμοκρασία επανερχόταν στα φυσιολογικά επίπεδα σε μικρό χρονικό διάστημα (10'-20'). Στις υπόλοιπες δύο ομάδες του πειραματισμού, μία μολυσμένη και μία μη μολυσμένη, η θερμοκρασία παρέμενε σταθερή στους 25 °C. Η σχετική υγρασία δεν ήταν απόλυτα ελεγχόμενη, ωστόσο η διακύμανσή της στο διάστημα της μείωσης της θερμοκρασίας και στο διάστημα της φυσιολογικής θερμοκρασίας δεν διέφερε και ήταν περίπου 30% με 40%. Συγκεκριμένα, οι ομάδες του πειραματισμού ήταν οι εξής 4:

- Η ομάδα **N**, τα ορνίθια της οποίας χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες χωρίς να μολυνθούν, με φυσιολογική θερμοκρασία θαλάμου (25 °C).
- Η ομάδα **CN**, στην οποία, από τη 17<sup>η</sup> ημέρα έως την 20<sup>η</sup> ημέρα της ζωής των ορνιθίων, η θερμοκρασία του θαλάμου μειώθηκε κατά 10 °C, φθάνοντας τους 15 °C, για 12 ώρες ημερησίως, από τις 09:00 έως τις 21:00.
- Η ομάδα **P**, τα ορνίθια της οποίας εκτρέφονταν σε φυσιολογική θερμοκρασία θαλάμου και μολύνθηκαν με *C. perfringens* 3 φορές ημερησίως (στις 09:00, στις

13:00 και στις 17:00) για τέσσερις συνεχόμενες ημέρες, τη 17<sup>η</sup>, τη 18<sup>η</sup>, τη 19<sup>η</sup> και την 20<sup>η</sup> και με *Eimeria* spp. τη 18<sup>η</sup> ημέρα της ζωής των ορνιθίων.

- Η ομάδα **CP**, στην οποία, από τη 17<sup>η</sup> ημέρα έως την 20<sup>η</sup> ημέρα, η θερμοκρασία θαλάμου μειώθηκε κατά 10 °C για 12 ώρες ημερησίως, από τις 09:00 έως τις 21:00 και τα ορνίθια μολύνθηκαν με *C. perfringens* 3 φορές ημερησίως (στις 09:00, στις 13:00 και στις 17:00) για τέσσερις συνεχόμενες ημέρες τη 17<sup>η</sup>, τη 18<sup>η</sup>, τη 19<sup>η</sup> και την 20<sup>η</sup> και με *Eimeria* spp. τη 18<sup>η</sup> ημέρα της ζωής των ορνιθίων.

### **1.3.5 Πειραματικός σχεδιασμός εμβολιασμού με ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο**

Στόχος του πειραματισμού ήταν η εκτίμηση της επίδρασης του εμβολιασμού με ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο στην παθογένεια της NE και τις αποδόσεις στα κρεοπαραγωγά ορνίθια. Ένας επιπλέον στόχος ήταν η καθιέρωση ενός πειραματικού μοντέλου αναπαραγωγής της NE, πιο αξιόπιστου και με μεγαλύτερη σταθερότητα και επαναληψιμότητα. Ο πειραματικός σχεδιασμός περιελάμβανε 5 ομάδες των 60 ορνιθίων. Οι πειραματικοί χειρισμοί που διενεργήθηκαν ήταν ο εμβολιασμός των νεοσσών με ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο και η μόλυνση των ορνιθίων με *C. perfringens*, με *E. maxima* και δεκαπλάσια δόση ΕΛΔ αντικοκκιδιακού εμβολίου .

Για την αναπαραγωγή της NE και την εκτίμηση της επίδρασης του αντικοκκιδιακού εμβολίου στην παθογένεια της NE χρησιμοποιήθηκαν φυσικές ωοκύστεις *E. maxima*, ετερόλογες ως προς τα στελέχη του αντικοκκιδιακού εμβολίου, με στόχο την αποφυγή αλληλεπιδράσεων. Ωστόσο, για τη συγκριτική μελέτη της επίδρασης της μόλυνσης με φυσικές ωοκύστεις και της μόλυνσης με πολλαπλάσια δόση ΕΛΔ αντικοκκιδιακού εμβολίου στην αναπαραγωγή της NE χρησιμοποιήθηκε σε μία επιπλέον ομάδα, η δεκαπλάσια δόση ΕΛΔ αντικοκκιδιακού εμβολίου. Συγκεκριμένα, οι ομάδες του πειραματισμού ήταν οι εξής 5:

- Η ομάδα **N**, τα ορνίθια της οποίας χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες, χωρίς να εμβολιαστούν ή να μολυνθούν.
- Η ομάδα **PN**, τα ορνίθια της οποίας εμβολιάστηκαν την 1<sup>η</sup> ημέρα της ζωής τους με το ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο.
- Η ομάδα **P**, τα ορνίθια της οποίας μολύνθηκαν με *C. perfringens* 3 φορές ημερησίως (στις 09:00, στις 13:00 και στις 17:00) για τέσσερις συνεχόμενες ημέρες, τη 17<sup>η</sup>, τη 18<sup>η</sup>, τη 19<sup>η</sup> και την 20<sup>η</sup> και με δεκαπλάσια δόση ΕΛΔ αντικοκκιδιακού εμβολίου τη 18<sup>η</sup> ημέρα.



- Η ομάδα **M**, τα ορνίθια της οποίας μολύνθηκαν με *C. perfringens* 3 φορές ημερησίως (στις 09:00, στις 13:00 και στις 17:00) για τέσσερις συνεχόμενες ημέρες, τη 17<sup>η</sup>, τη 18<sup>η</sup>, τη 19<sup>η</sup> και την 20<sup>η</sup> και με *E. maxima* τη 18<sup>η</sup> ημέρα.
- Η ομάδα **PM**, τα ορνίθια της οποίας εμβολιάστηκαν την 1<sup>η</sup> ημέρα της ζωής τους με το ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο και μολύνθηκαν με *C. perfringens* 3 φορές ημερησίως (στις 09:00, στις 13:00 και στις 17:00) για τέσσερις συνεχόμενες ημέρες, τη 17<sup>η</sup>, τη 18<sup>η</sup>, τη 19<sup>η</sup> και την 20<sup>η</sup> και με *E. maxima* τη 18<sup>η</sup> ημέρα.

Οι πειραματισμοί διεξήχθησαν στους πειραματικούς θαλάμους της μονάδας Παθολογίας Πτηνών, της Κλινικής Παραγωγικών Ζώων, της Κτηνιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ. (αριθμός καταχώρησης EL 54 BIO 03). Η πειραματική διαδικασία ήταν σύμφωνη με το νομικό πλαίσιο που διέπει τη διενέργεια πειραματισμών (αριθμός έγκρισης 13/13716). Όλοι οι πειραματικοί χειρισμοί και η ευθανασία των ορνιθίων διεξήχθησαν σύμφωνα με τη νομοθεσία που διέπει την εφαρμογή τους (Κανονισμός 2007/526/ΕΚ).

### **1.4 Μόλυνση με *C. perfringens***

Το στελέχος *C. perfringens* 56, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τη μόλυνση των ορνιθίων, προμηθεύτηκε από το Εργαστήριο Μικροβιολογίας της Κτηνιατρικής Σχολής της Γάνδης του Βελγίου. Απομονώθηκε από ορνίθιο με σοβαρές αλλοιώσεις ΝΕ, το οποίο προερχόταν από μονάδα κρεοπαραγωγών ορνιθίων με ιστορικό καθυστέρησης στην ανάπτυξη. Στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας της Κτηνιατρικής Σχολής της Γάνδης διενεργήθηκε μοριακός και φαινοτυπικός χαρακτηρισμός του στελέχους, το οποίο χαρακτηρίστηκε ως τύπου Α (απουσία των υπεύθυνων γονιδίων για την έκφραση της β<sub>2</sub> τοξίνης και της εντεροτοξίνης), ικανό να παράγει in vitro μέτριες ποσότητες τοξίνης -α (Gholamiandehkordi και συν., 2006).

Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας του *C. perfringens* στο αντιβιοτικό ριφαμπικίνη έγινε με διαδοχικές καλλιέργειες σε αναερόβιες συνθήκες (Anaerocult A, 1.13829.0001, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), σε αιματούχο υπόστρωμα (Columbia blood agar, 01-034, Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Spain), το οποίο περιείχε 5% απινιδωμένο αίμα προβάτου και αυξανόμενες συγκεντρώσεις ριφαμπικίνης (R 3501- 1G, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany). Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό ριφαμπικίνη έγινε με στόχο τη διαφοροποίηση του στελέχους *C. perfringens*, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τη μόλυνση των ορνιθίων, από τα στελέχη *C. perfringens* της φυσιολογικής εντερικής μικροχλωρίδας.

Πριν τη μόλυνση των ορνιθίων, το *C. perfringens* καλλιεργήθηκε αναερόβια στους 37 °C για 24 ώρες σε BHI broth (Brain Heart Infusion broth, 02-599, Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Spain), το οποίο περιείχε 20 mg/ml ριφαμπικίνη. Σε κάθε ορνίθιο έγινε ενοφθαλμισμός 1 ml ζωμού, το οποίο περιείχε περίπου  $4 \times 10^8$  cfu *C. perfringens*, με τη χρησιμοποίηση οισοφαγικού καθετήρα.

### **1.5 Μόλυνση με *Eimeria* spp.**

Τα ορνίθια μολύνθηκαν με *Eimeria* spp. για την πρόκληση αλλοιώσεων στο εντερικό τοίχωμα και τη διαμόρφωση ευνοϊκών συνθηκών για τον πολλαπλασιασμό και την τοξινογένεση του *C. perfringens*. Η μολύνουσα δόση περιελάμβανε τη δεκαπλάσια δόση του ΕΛΔ αντικοκκιδιακού εμβολίου Paracox™-5 (Intervet/Schering-Plough Animal Health Α.Φ.Β.Ε.Ε., Αθήνα).

Κάθε εμβολιακή δόση περιέχει σπορογόνες ωοκύστες, οι οποίες προέρχονται από πέντε άωρες κοκκιδιακές γραμμές:

- 500 – 600 ωοκύστες *E. tenella*.HP
- 200 – 260 ωοκύστες *E. maxima*.CP
- 100 – 130 ωοκύστες *E. maxima*.MFP
- 500 – 650 ωοκύστες *E. acervulina* HP και
- 1000 – 1300 ωοκύστες *E. mitis*.HP

Η καταμέτρηση των ωοκύστεων έγινε *in vitro* τη μεθοδολογία του παρασκευαστή κατά το στάδιο της αναδέυσεως και κατά την απελευθέρωση του εμβολίου. Το εμβόλιο περιέχει δύο σειρές της *E. maxima*, λόγω της μεγάλης αντιγονικής ποικιλίας που παρουσιάζει αυτό το είδος *Eimeria* spp.

Τα 4 ml του εμβολίου που περιείχε η συσκευασία, τα οποία ισοδυναμούσαν με 1000 εμβολιακές δόσεις, αραιώθηκαν με 96 ml νερού, έτσι ώστε κάθε 1 ml του τελικού διαλύματος να ισοδυναμεί με τη δεκαπλάσια δόση του εμβολίου. Σε κάθε ορνίθιο ενοφθαλμίστηκε, με τη χρησιμοποίηση οισοφαγικού καθετήρα, 1 ml τελικού διαλύματος, το οποίο περιείχε 5.000 – 6.500 ωοκύστες *E. acervulina*, 3.000 – 3.900 ωοκύστες *E. maxima*, 10.000 – 13.000 ωοκύστες *E. mitis* και 5.000 – 6.000 ωοκύστες *E. tenella*.

### **1.6 Μόλυνση με *Eimeria maxima***

Οι φυσικές ωοκύστες *E. maxima* (Weybridge strain) ήταν ευγενική προσφορά του Dr. R. Marshall (Veterinary Laboratories Agency, Weybridge, UK).

### **1.7 Εμβολιασμός κατά της κοκκιδίωσης**

Για τον εμβολιασμό κατά της κοκκιδίωσης χρησιμοποιήθηκε το ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο Paracox™-5 ( Intervet/Schering-Plough Animal Health A.Φ.Β.Ε.Ε., Αθήνα).

Από τα 4 ml του εμβολίου που περιείχε η συσκευασία, τα οποία ισοδυναμούσαν με 1000 δόσεις, χρησιμοποιήθηκαν τα 0,4 ml (100 δόσεις) τα οποία αραιώθηκαν με 49,6 ml νερού, έτσι ώστε κάθε δόση του εμβολίου να ισοδυναμεί με 0,5 ml του διαλύματος των 50 ml. Ο εμβολιασμός των ορνιθίων έγινε την 1<sup>η</sup> ημέρα της ζωής τους, με τη χρησιμοποίηση οισοφαγικού καθετήρα.

Η εκτροφή των ορνιθίων έγινε σε δάπεδο με στρωμή από πριονίδι, έτσι ώστε να επιτρέπεται η επιβίωση των ωοκύστεων και να πραγματοποιείται η ανακύκλωση των μολύνσεων, η οποία αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την αποτελεσματική χρησιμοποίηση του εμβολίου. Επίσης, το σιτηρέσιο δεν περιείχε ίχνη αντιβιοτικών και αντικοκκιδιακών φαρμάκων, τα οποία θα μπορούσαν να καταστρέψουν τις εμβολιακές ωοκύστες και να μειώσουν την αποτελεσματικότητα του εμβολιασμού.

### **1.8 Εμβολιασμός κατά της Λοιμώδους νόσου του Θυλάκου**

Τη 16<sup>η</sup> ημέρα κάθε πειραματισμού, τα ορνίθια όλων των ομάδων εμβολιάστηκαν μέσω του πόσιμου νερού κατά της IBD (Nobilis Gumboro D78, Intervet/Schering-Plough Animal Health A.Φ.Β.Ε.Ε., Αθήνα). Σκοπός του εμβολιασμού ήταν η πρόκληση ανοσοκαταστολής και η προδιάθεση στην εκδήλωση της NE (McReynolds και συν., 2004).

### **1.9 Κλινική εξέταση, μέτρηση ΣΒ και υπολογισμός ΔΜΤ**

Κατά τη διάρκεια των πειραματισμών, 3 φορές ημερησίως, πρωί, μεσημέρι και βράδυ, γινόταν κλινική εξέταση των ορνιθίων της κάθε ομάδας, η οποία περιελάμβανε την εκτίμηση της γενικής κατάστασης, της ομοιομορφίας στην ανάπτυξη και της εμφάνισης συμπτωμάτων από το πεπτικό, το αναπνευστικό, το νευρικό και το μυοσκελετικό σύστημα των ορνιθίων.

Η ζύγιση των ορνιθίων της κάθε ομάδας γινόταν το πρωί της 1<sup>ης</sup> ημέρας, της 10<sup>ης</sup>, της 16<sup>ης</sup>, της 17<sup>ης</sup> και της 20<sup>ης</sup> ημέρας.

Ο ΔΜΤ υπολογίστηκε από τη 10<sup>η</sup> έως και τη 16<sup>η</sup> ημέρα και από τη 17<sup>η</sup> έως και την 20<sup>η</sup> ημέρα του πειραματισμού. Για τον υπολογισμό του ΔΜΤ, διαιρέθηκε η ποσότητα τροφής που καταναλώθηκε στο συγκεκριμένο χρονικό διάστημα με την αύξηση του ΣΒ που πραγματοποιήθηκε σε αυτό το χρονικό διάστημα.

### **1.10 Παρασιτολογική εξέταση**

Η παρασιτολογική εξέταση κοπράνων διενεργήθηκε την 9<sup>η</sup>, τη 16<sup>η</sup> και την 20<sup>η</sup> ημέρα της ζωής των ορνιθίων, με τη μέθοδο επίπλευσης (Χαραλαμπίδης και συν., 2006):

Τεχνική μεθόδου επίπλευσης

- Εναιώρηση 2 g κοπράνων σε σωλήνα φυγοκέντρου με νερό.
- Διήθηση εναιωρήματος με γάζα σε σωλήνα φυγοκέντρου.
- Φυγοκέντρηση του στραγγισμένου εναιωρήματος στις 1500 στροφές για 3 λεπτά.
- Απόρριψη του υπερκείμενου υγρού, έως το ύψος του 1 cm πάνω από το ίζημα.
- Γέμισμα του σωλήνα με νερό έως 1 cm κάτω από τα χείλη του σωλήνα και ανάδευση με λεπτό ξύλο.
- Φυγοκέντρηση του στραγγισμένου εναιωρήματος στις 1500 στροφές για 3 λεπτά.
- Επανάληψη των σταδίων 4, 5 και 6, έως ότου το διάλυμα μετά τη φυγοκέντρηση γίνει διαυγές.
- Απόρριψη του υπερκείμενου υγρού, έως το ύψος του 1 cm πάνω από το ίζημα.
- Πλήρωση του σωλήνα με κορεσμένο διάλυμα NaCl, ανάδευση με λεπτό ξύλο και συμπλήρωση με κορεσμένο διάλυμα NaCl, έως το σχηματισμό μηνίσκου.
- Τοποθέτηση της καλυπτρίδας στο μηνίσκο και αναμονή για 60 λεπτά.
- Τοποθέτηση της καλυπτρίδας σε αντικειμενοφόρο πλάκα και παρατήρησή της σε οπτικό μικροσκόπιο.

Επίσης, κατά τη νεκροτομή των ορνιθίων διενεργήθηκε δειγματοληπτικά μικροσκοπική εξέταση επιχρισμάτων εντερικού βλεννογόνου και περιεχομένου από το δωδεκαδάκτυλο, τη νήστιδα, τον ειλέο και τα τυφλά, για την επιβεβαίωση της μόλυνσης ή την απουσία επιμόλυνσης από *Eimeria* spp.

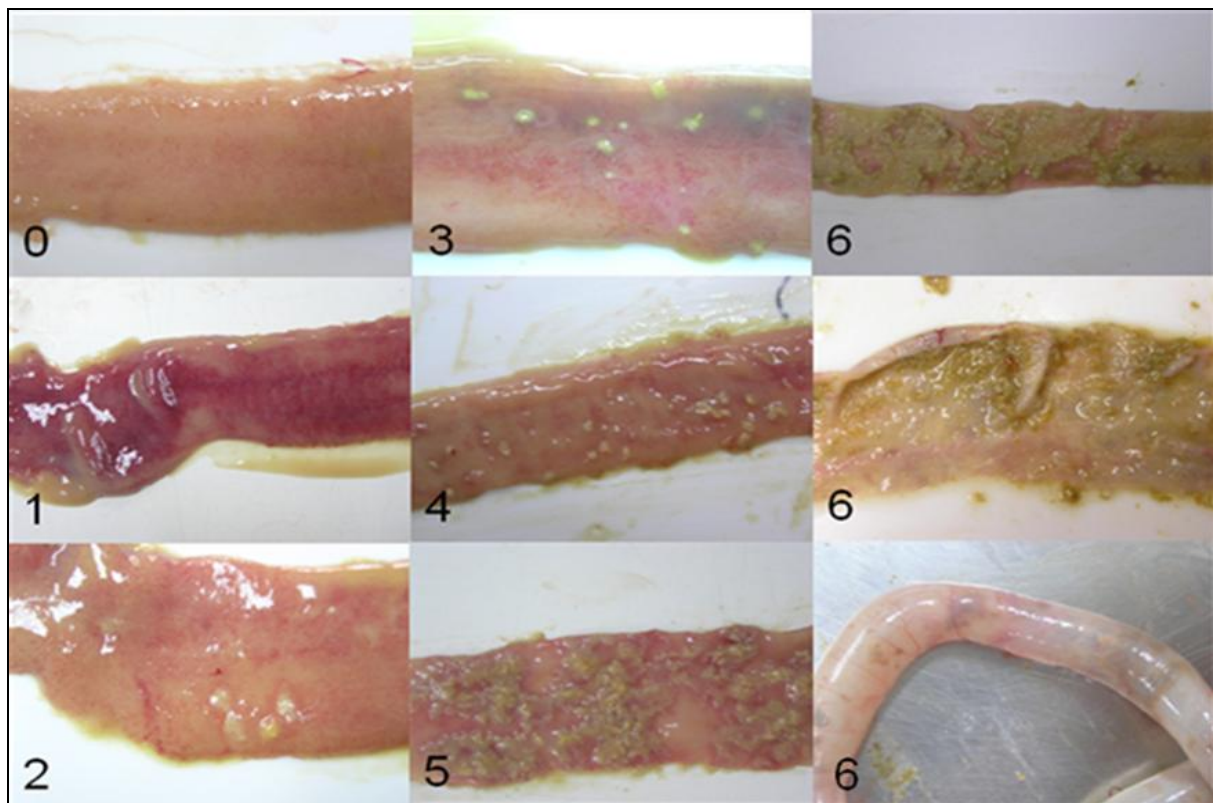
### **1.11 Μακροσκοπική εξέταση**

Αμέσως μετά τη νεκροτομή, ακολούθησε η απομάκρυνση των σπλάχνων και του γαστρεντερικού σωλήνα από κάθε ορνίθιο. Ο γαστρεντερικός σωλήνας διαιρέθηκε στα επιμέρους του τμήματα, το δωδεκαδάκτυλο (1 cm μετά το μυώδη στόμαχο έως τον επικουρικό παγκρεατικό πόρο), τη νήστιδα (από τον επικουρικό παγκρεατικό πόρο έως το εκκόλπωμα του Meckel), τον ειλέο (από το εκκόλπωμα του Meckel έως την είσοδο των τυφλών) και τα τυφλά (Μάγρας, 2004).

Η μακροσκοπική εξέταση του εντέρου και η βαθμολόγηση των αλλοιώσεων της ΝΕ διενεργήθηκε με βάση την κλίμακα βαθμολόγησης αλλοιώσεων ΝΕ των Keyburn και συν. (2006).

**Πίνακας 1.2.** Κλίμακα βαθμολόγησης αλλοιώσεων ΝΕ στον εντερικό βλεννογόνο

ΜΑΚΡΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ	
ΒΑΘΜΟΣ	
0	Φυσιολογικό έντερο.
1	Συμφόρηση του εντέρου ή/και λέπτυνση του εντερικού τοιχώματος.
2	1 έως 5 νεκρωτικές εστίες μεγέθους 1-5 mm στον εντερικό βλεννογόνο.
3	6 έως 15 νεκρωτικές εστίες μεγέθους 1-5 mm στον εντερικό βλεννογόνο.
4	Περισσότερες από 15 νεκρωτικές εστίες μεγέθους 1-5 mm στον εντερικό βλεννογόνο.
5	Συνένωση νεκρωτικών εστιών και σχηματισμός πλακών μεγέθους 2-3 cm στον εντερικό βλεννογόνο.
6	Νέκρωση ολόκληρου του εντερικού βλεννογόνου και διάταση του εντέρου, τυπικό των κλινικών περιστατικών ΝΕ.

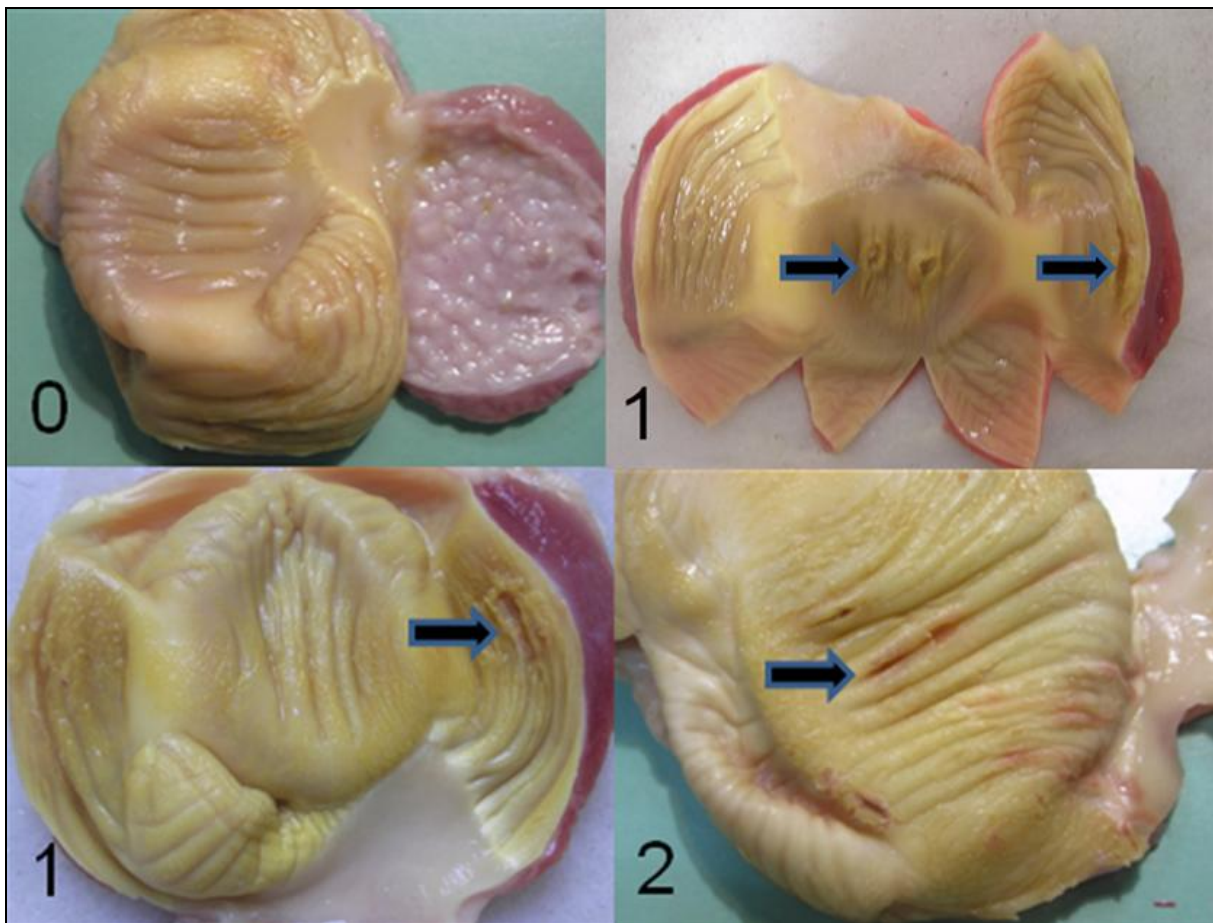


**Εικόνα 1.1.** Κλίμακα βαθμολόγησης αλλοιώσεων ΝΕ στον εντερικό βλεννογόνο

Η μακροσκοπική εξέταση και η βαθμολόγηση των αλλοιώσεων του μυώδους στομάχου των ορνιθίων έγινε με βάση την κλίμακα βαθμολόγησης μακροσκοπικών αλλοιώσεων μυώδους στομάχου των Novoa-Garrido και συν. (2006).

**Πίνακας 1.3.** Κλίμακα βαθμολόγησης μακροσκοπικών αλλοιώσεων μυώδους στομάχου

<b>ΜΑΚΡΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ</b>	
<b>ΒΑΘΜΟΣ</b>	
0	Φυσιολογικός μυώδης στόμαχος.
1	Αλλοιώσεις στον επιδερμικό χιτώνα του μυώδους στομάχου.
2	Αλλοιώσεις (έλκη) που διαπερνούν τον επιδερμικό χιτώνα του μυώδους στομάχου και φτάνουν στο βλεννογόνο.



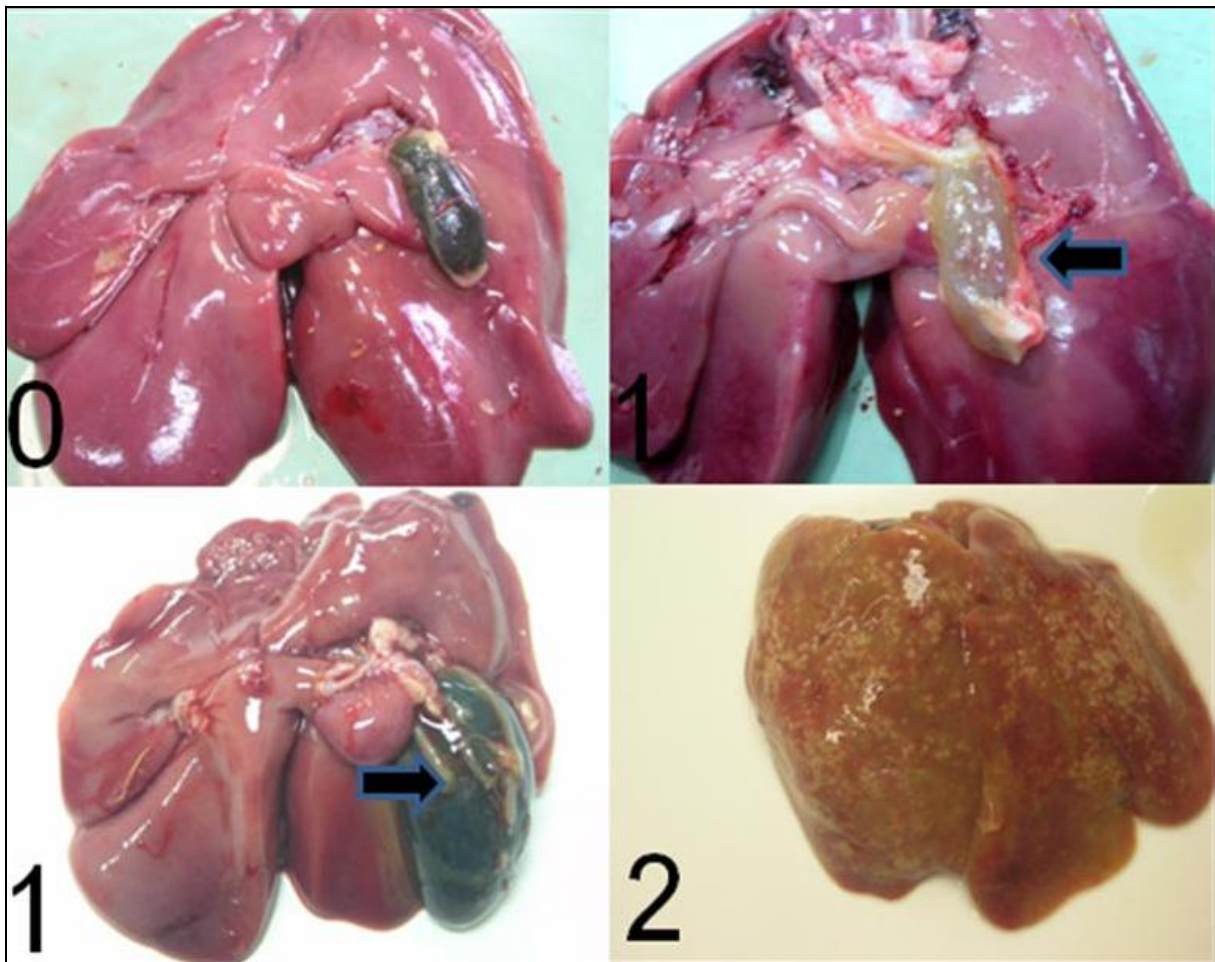
**Εικόνα 1.2.** Κλίμακα βαθμολόγησης μακροσκοπικών αλλοιώσεων μυώδους στομάχου

Η μακροσκοπική εξέταση και βαθμολόγηση των αλλοιώσεων του ήπατος βασίστηκε στα εξής χαρακτηριστικά:

- Διόγκωση και συμφόρηση ήπατος.
- Ύπαρξη νεκρωτικών αλλοιώσεων στο ήπαρ.
- Πάχυνση των τοιχωμάτων της χοληδόχου κύστης (ΧΚ).
- Ποσότητα και χρωματισμός χολής.

**Πίνακας 1.4.** Κλίμακα βαθμολόγησης μακροσκοπικών αλλοιώσεων ήπατος

ΜΑΚΡΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ	
ΒΑΘΜΟΣ	
0	Φυσιολογικό ήπαρ, χοληδόχος κύστη, χολή.
1	Συμφόρηση και διόγκωση ήπατος ή/και πάχυνση των τοιχωμάτων της ΧΚ ή/και αύξηση της ποσότητας ή/και αποχρωματισμός της χολής.
2	Ύπαρξη νεκρωτικών αλλοιώσεων στο ήπαρ.



**Εικόνα 1.3.** Κλίμακα βαθμολόγησης μακροσκοπικών αλλοιώσεων ήπατος

### **1.12 Ιστοπαθολογική εξέταση**

Αμέσως μετά την ευθανασία των πειραματόζωων, ακολούθησε η νεκροτομή και η λήψη ιστοτεμαχίων. Ιστοτεμάχια λαμβάνονταν από τμήματα του εντέρου (δωδεκαδάκτυλο, νήστιδα, ειλεός) και από το ήπαρ. Τα ιστοτεμάχια μονιμοποιούνταν σε διάλυμα ουδέτερης φορμόλης (10% φορμόλη σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου) με pH 7,3 για 48-72 ώρες. Ακολούθως εγκλείονταν σε παραφίνη και λαμβάνονταν τομές πάχους 4-6μm. Για τη μελέτη της γενικής ιστοπαθολογικής εικόνας με το φωτονικό μικροσκόπιο, οι τομές χρωματίζονταν με τη μέθοδο της αιματοξυλίνης-εωσίνης (H&E).

### **1.13 Μέτρηση pH εντερικού περιεχομένου**

Η μέτρηση του pH του περιεχομένου του δωδεκαδακτύλου και των τυφλών διενεργήθηκε αμέσως μετά τη νεκροτομή. Το περιεχόμενο του κάθε εντερικού τμήματος από κάθε ορνίθιο τοποθετήθηκε σε σωλήνα φυγοκέντρου και ομογενοποιήθηκε με τη χρησιμοποίηση αναδευτήρα στροβιλισμού για ένα λεπτό (Vortex-Genie, K- 550 GE, Scientific industries inc., Springfield, Mass 01103). Αμέσως μετά την ομογενοποίηση, το pH του περιεχομένου μετρήθηκε με τη χρησιμοποίηση ηλεκτρονικού, αυτόματου πεχαμέτρου (pH 315i, WTW, Germany). Η μέτρηση του pH του περιεχομένου της νήστιδας και του ειλεού διενεργήθηκε στο υπερκείμενο υγρό, αμέσως μετά τη φυγοκέντρωσή του.

### **1.14 Μέτρηση ιξώδους εντερικού περιεχομένου**

Η μέτρηση του ιξώδους του εντερικού περιεχομένου έγινε με βάση την τεχνική των Waldenstedt και συν. (2000), με ήπιες τροποποιήσεις. Οι σωλήνες φυγοκέντρου με το περιεχόμενο της νήστιδας και του ειλεού φυγοκεντρήθηκαν στις 4.500 στροφές για 45 λεπτά σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στους 4 °C. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο υγρό από κάθε δοκιμαστικό σωλήνα μεταφέρθηκε σε διαφορετικό σωλήνα φυγοκέντρου. Η μέτρηση του ιξώδους διενεργήθηκε στη θερμοκρασία των 25 °C με τη χρησιμοποίηση ηλεκτρονικού, αυτόματου ιξωδομέτρου Brookfield (LVDV II+PCP Cone/Plate, Brookfield Engineering Laboratories, Stoughton, MA, USA). Η τιμή του ιξώδους εκφράστηκε σε Centipoises (cP).

### **1.15 Βακτηριολογική εξέταση**

Η βακτηριολογική εξέταση, για την απομόνωση του *C. perfringens*, διενεργήθηκε από δείγματα μυώδους στόμαχου, δωδεκαδακτύλου, νήστιδας, ειλεού, και ήπατος. Η καλλιέργεια των δειγμάτων έγινε σε αιματούχο εκλεκτικό υπόστρωμα (*C. perfringens* sfp selective supplement. SR0093 Oxoid Ltd, Cambridge, UK), σε αναερόβιες συνθήκες για 24 ώρες στους



37 °C. Η καλλιέργεια των δειγμάτων από τις ομάδες των ορνιθίων που μολύνθηκαν με το στέλεχος *C. perfringens* 56 έγινε σε υπόστρωμα που περιείχε επιπλέον 20 mg /ml ριφαμπικίνη. Ως αποικίες *C. perfringens* χαρακτηρίστηκαν οι μεγάλες (3 με 5 mm), ανώμαλες, στιλπνές αποικίες που έφεραν διπλή ζώνη αιμόλυσης (μία εσωτερική πλήρης και μία εξωτερική ατελής).

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του *C. perfringens* στα τυφλά διεξήχθη με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων, σύμφωνα με τους Kaldhusdal και συν. (1999):

Τεχνική ποσοτικού προσδιορισμού *C. perfringens* στα τυφλά

- Ζύγιση του τυφλού μαζί με το περιεχόμενο.
- Διάνοιξη του τυφλού.
- Αραίωση με δεκαπλάσια ποσότητα buffer PBS (18912-014, Gibco, UK) ( $10^1$  αραίωση,  $10^{-1}$ ).
- Ομογενοποίηση.
- Ενοφθαλμισμός 180 μl PBS σε κάθε βοθρίο της 96 πλάκας.
- Ενοφθαλμισμός 20 μl από την πρώτη αραίωση, σε βοθρίο της 96 πλάκας που περιέχει 180 μl PBS ( $2^1$  αραίωση,  $10^{-2}$ ).
- Ενοφθαλμισμός 20 μl από τη δεύτερη αραίωση σε βοθρίο της 96 πλάκας που περιέχει 180 μl PBS ( $3^1$  αραίωση,  $10^{-3}$ ).
- Επανάληψη του σταδίου έως την όγδοη αραίωση ( $10^{-8}$ ).
- Από κάθε αραίωση ενοφθαλμίζονται 20 μl σε εκλεκτικό αιματούχο υπόστρωμα.
- Επανάληψη του προηγούμενου σταδίου πέντε φορές.
- Επώαση στους 37 °C για 24 ώρες σε αναερόβιες συνθήκες
- Επιλογή της αραίωσης στην οποία ο αριθμός των αποικιών είναι μεταξύ 30 -100.
- Άθροιση των αποικιών από όλες τις επαναλήψεις της αραίωσης και διαίρεση με τον αριθμό των επαναλήψεων (5).
- Πολλαπλασιασμός με την αραίωση που επιλέχθηκε  $10^n$ .
- Πολλαπλασιασμός με το 50 (αρχική ποσότητα 20 μl) και με την επιλεγμένη αραίωση ( $10^n$ ) έτσι ώστε να το αποτέλεσμα να εκφράζει τον αριθμό των αποικιών cfu /g τυφλού.

### 1.16 Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση των πειραματικών δεδομένων χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι τόσο της περιγραφικής όσο και της συμπερασματικής στατιστικής.

Ειδικότερα, αναφορικά με το ιξώδες της νήστιδας και του ειλεού, το pH των επί μέρους τμημάτων του γαστρεντερικού σωλήνα, καθώς και του μέσου όρου του βαθμού αλλοιώσεων της NE και τον πληθυσμό του *C. perfringens* στα τυφλά ως προς την πειραματική ομάδα των ορνιθίων, χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία της ανάλυσης των διακυμάνσεων μίας κατεύθυνσης, σύμφωνα με το «εντελώς τυχαιοποιημένο» σχέδιο

ανάλυσης (One Way Anova). Η κανονικότητα των πειραματικών δεδομένων ελέγχθηκε με τους ελέγχους των Shapiro-Wilk και του Lilliefors, ενώ η ομοιογένεια των διακυμάνσεων ελέγχθηκε με τον έλεγχο του Levene. Στις περιπτώσεις που κρίθηκε αναγκαίο, έγινε ο κατάλληλος μετασχηματισμός των πρωτογενών δεδομένων (π.χ. σε νεπέριους λογαρίθμους, σε τετραγωνική ρίζα, κ.λ.π.), με στόχο την κανονικοποίησή τους (Zolman, 1993).

Όπου οι προϋποθέσεις αυτές επιτεύχθηκαν και η ανάλυση διακύμανσης αξιολογήθηκε ως στατιστικά σημαντική, χρησιμοποιήθηκε ο νέος έλεγχος του πολλαπλού εύρους του Duncan, με στόχο την αξιολόγηση της ακριβούς θέσης των στατιστικών διαφορών. Σε περιπτώσεις ετερογένειας των διακυμάνσεων και μη κανονικότητας των δεδομένων, χρησιμοποιήθηκε ο μη παραμετρικός έλεγχος των Kruskal-Wallis και στη συνέχεια ο έλεγχος των Mann-Whitney.

Παράλληλα, προκειμένου να αξιολογηθεί στατιστικά ο βαθμός μακροσκοπικής αλλοίωσης του εντέρου, του μυώδους στομάχου και του ήπατος, καθώς επίσης και η συχνότητα απομόνωσης του *C. perfringens* από τα παραπάνω όργανα, μεταξύ των πειραματικών ομάδων, έγινε έλεγχος ομοιογένειας με την κατανομή  $\chi^2$  (Μπάτζιος, 1999: Zar, 1999). Στις περιπτώσεις στατιστικής σημαντικότητας, έγινε ανάλυση των «προσαρμοσμένων τυποποιημένων καταλοίπων» (Adjusted Standardized Residuals) των θεωρητικών ως προς τις παρατηρηθείσες συχνότητες στην αλλοίωση των ιστών (Norusis, 1999).

Όλοι οι έλεγχοι υποθέσεων έγιναν σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ή 10% εάν διαφορετικά σημειώνεται ( $P \leq 0.05$  ή  $P \leq 0.10$  για \*). Για τις αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό στατιστικής SPSS 15.0.



## **2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

### **2.1 Πειραματισμός φυσικού περιορισμού διατροφής**

#### **2.1.1 Σωματικό βάρος και δείκτης μετατρεψιμότητας της τροφής**

Στον **πίνακα 2.1**, παρουσιάζεται το ΣΒ ανά ορνίθιο όλων των ομάδων πριν και μετά τη μόλυνση και το φυσικό περιορισμό της διατροφής. Οι τιμές του ΔΜΤ, πριν και μετά την εφαρμογή των πειραματικών χειρισμών, παρουσιάζονται στον **πίνακα 2.2**.

**Πίνακας 2.1.** ΣΒ (g) ανά ομάδα ορνιθίων κατά πειραματισμό του φυσικού περιορισμού της διατροφής ανάλογα με την ηλικία

<b>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ</b>				
<b>ΗΛΙΚΙΑ</b>	<b>N</b>	<b>SN</b>	<b>P</b>	<b>SP</b>
<b>1<sup>η</sup> ημέρα</b>	45	40	45	40
<b>10<sup>η</sup> ημέρα</b>	120	112	120	120
<b>16<sup>η</sup> ημέρα</b>	340	332	340	340
<b>17<sup>η</sup> ημέρα</b>	380	337	365	355
<b>21<sup>η</sup> ημέρα</b>	650	615	605	550

**Πίνακας 2.2.** ΔΜΤ ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό του φυσικού περιορισμού της διατροφής

<b>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ</b>				
<b>ΔΙΑΣΤΗΜΑ</b>	<b>N</b>	<b>SN</b>	<b>P</b>	<b>SP</b>
<b>10<sup>η</sup> -16<sup>η</sup> ημέρα</b>	2,76	2,37	3,40	2,60
<b>17<sup>η</sup> -21<sup>η</sup> ημέρα</b>	2,25	1,80	2,33	2,00

Την 1<sup>η</sup>, την 10<sup>η</sup> και τη 16<sup>η</sup> ημέρα της ζωής των ορνιθίων, πριν τη μόλυνση και το φυσικό περιορισμό της διατροφής, το ΣΒ ανά ορνίθιο όλων των ομάδων ήταν παρόμοιο. Αντίθετα, μετά τη μόλυνση και το φυσικό περιορισμό της τροφής, το ΣΒ ανά ορνίθιο μεταξύ των ομάδων ήταν διαφορετικό. Το υψηλότερο ΣΒ παρατηρήθηκε στην ομάδα N, η οποία δεν υπέστη κανέναν πειραματικό χειρισμό, ενώ το χαμηλότερο ΣΒ παρατηρήθηκε στην ομάδα SP, η οποία υπέστη μόλυνση και φυσικό περιορισμό της διατροφής.

Τόσο η μόλυνση όσο και ο φυσικός περιορισμός της διατροφής είχαν άμεση επίδραση στο ΣΒ των ορνιθίων. Συγκεκριμένα, τη 17<sup>η</sup> και την 21<sup>η</sup> ημέρα τα ορνίθια της ομάδας SN, τα

οποία είχαν υποστεί στέρηση της τροφής, είχαν μικρότερο ΣΒ από τα ορνίθια της ομάδας N, στα οποία η κατανάλωση τροφής γινόταν κατά βούληση. Την 21<sup>η</sup> ημέρα τα ορνίθια μολυσμένων ομάδων, P και SP, είχαν μικρότερο ΣΒ από τα ορνίθια των ομάδων που δεν μολύνθηκαν.

Ο ΔΜΤ ήταν πολύ υψηλός σε όλες τις ομάδες, ιδιαίτερα πριν τους πειραματικούς χειρισμούς. Η μετάβαση από το σιτηρέσιο Β στο σιτηρέσιο Γ, το οποίο περιείχε ως πηγή πρωτεϊνών το ιχθυάλευρο αντί της σόγιας, βελτίωσε το ΔΜΤ. Η μόλυνση δεν επηρέασε το ΔΜΤ, σε αντίθεση με το φυσικό περιορισμό της διατροφής, ο οποίος βελτίωσε το ΔΜΤ, πιθανόν, λόγω της μειωμένης κατανάλωσης τροφής. Ο ΔΜΤ της ομάδας SN, στο διάστημα 17<sup>η</sup>-21<sup>η</sup> ημέρα, ήταν μικρότερος από το ΔΜΤ της ομάδας N. Επίσης, το ίδιο διάστημα, ο ΔΜΤ της ομάδας SP ήταν μικρότερος από το ΔΜΤ της ομάδας P.

### **2.1.2 Παρασιτολογική εξέταση**

Τα αποτελέσματα της παρασιτολογικής εξέτασης των κοπράνων που διενεργήθηκε την 9<sup>η</sup>, τη 16<sup>η</sup> και την 20<sup>η</sup> ημέρα της ζωής των ορνιθίων στις ομάδες N και SN ήταν αρνητικά, υποδηλώνοντας την απουσία επιμόλυνσης των ορνιθίων με *Eimeria* spp. Στις ομάδες P και SP τα αποτελέσματα της εξέτασης ήταν αρνητικά την 9<sup>η</sup> και τη 16<sup>η</sup> ημέρα της ζωής των ορνιθίων και θετικά την 20<sup>η</sup> ημέρα, επιβεβαιώνοντας την επιτυχή μόλυνση με *Eimeria* spp. που διεξήχθη τη 18<sup>η</sup> ημέρα. Επίσης, τα αποτελέσματα της μικροσκοπικής εξέτασης των επιχρισμάτων από τον εντερικό βλεννογόνο και το περιεχόμενο ήταν αρνητικά για τις ομάδες N και SN και θετικά για τις ομάδες P και SP.

### **2.1.3 Μακροσκοπική εξέταση**

Το ποσοστό των ορνιθίων που εκδήλωσαν αλλοιώσεις ΝΕ και ο μέσος όρος (μ.ο.) του βαθμού αλλοιώσεων, όπως πρόέκυψε μετά από τη μακροσκοπική εξέταση του εντέρου, παρουσιάζονται αναλυτικά στους πίνακες 2.3. και 2.4., αντίστοιχα.

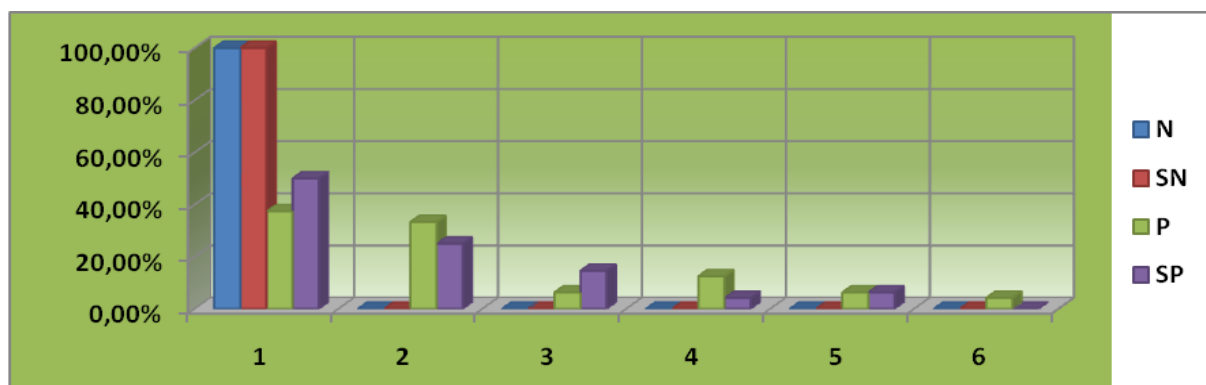
**Πίνακας 2.3.** Ποσοστό ορνιθίων και βαθμός αλλοιώσεων NE ανά ομάδα κατά τον πειραματισμό του φυσικού περιορισμού της διατροφής

ΒΑΘΜΟΣ	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ			
	N	SN	P	SP
1,00	100,0%	100,0%	37,4%	50,0%
2,00	0,0%	0,0%	33,3%	25,0%
3,00	0,0%	0,0%	6,3%	14,6%
4,00	0,0%	0,0%	12,5%	4,2%
5,00	0,0%	0,0%	6,3%	6,3%
6,00	0,0%	0,0%	4,2%	0,0%
<b>ΣΥΝΟΛΙΚΑ</b>	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

**Πίνακας 2.4.** Μέσος όρος βαθμού αλλοιώσεων NE ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό του φυσικού περιορισμού της διατροφής ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )

Μ.Ο	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ			
	N	SN	P	SP
	1,00±0,00 <sup>a</sup>	1,00±0,00 <sup>a</sup>	2,29±0,21 <sup>b</sup>	1,92±0,17 <sup>b</sup>

**Σημείωση:** <sup>a, b</sup> Μέσες τιμές με διαφορετικό εκθέτη διαφέρουν σημαντικά (P≤0.05).



**Διάγραμμα 2.1.** Ποσοστό ορνιθίων και βαθμός αλλοιώσεων NE ανά ομάδα κατά τον πειραματισμό του φυσικού περιορισμού της διατροφής

Ο μ.ο. του βαθμού αλλοιώσεων NE των ορνιθίων των ομάδων N και SN ήταν 1, υποδηλώνοντας ότι κανένα ορνίθιο δεν εμφάνισε αλλοιώσεις NE. Αυτό είναι φυσιολογικό και αναμενόμενο γιατί τα ορνίθια των ομάδων αυτών δεν μολύνθηκαν. Αντίθετα, ο μ.ο. του βαθμού αλλοιώσεων των ομάδων P και SP ήταν μεγαλύτερος από 1, υποδηλώνοντας ότι στα ορνίθια των ομάδων αυτών εκδηλώθηκαν αλλοιώσεις NE στον εντερικό βλεννογόνο.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

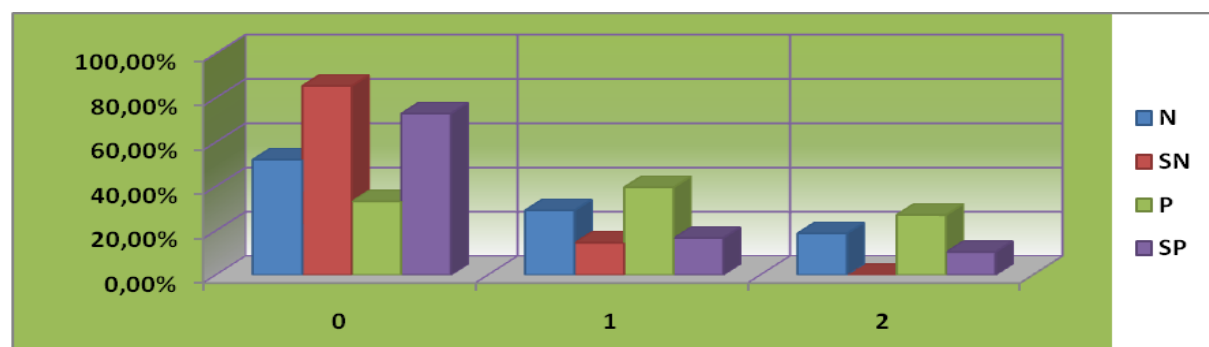
Μεταξύ των πειραματικών ομάδων διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική ( $P \leq 0.05$ ) διαφορά. Συγκεκριμένα, ο μ.ο. του βαθμού αλλοιώσεων NE των μη μολυσμένων ομάδων ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) μικρότερος από το μ.ο. των μολυσμένων ομάδων. Επίσης, μεταξύ των μολυσμένων ομάδων, ο μ.ο. του βαθμού αλλοιώσεων NE ήταν μεγαλύτερος στην ομάδα P, συγκριτικά με της ομάδας SP, χωρίς όμως να διαφέρει στατιστικά ( $P > 0.10$ ).

Πιο αναλυτικά, όπως φαίνεται και από τα στοιχεία του **πίνακα 2.3.**, το ποσοστό των ορνιθίων με το μέγιστο βαθμό αλλοιώσεων NE (6) ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) μεγαλύτερο στην ομάδα P, ενώ στην ομάδα SP παρατηρήθηκε η αντίθετη εικόνα (κανένα ορνίθιο δεν εμφάνισε το μέγιστο βαθμό αλλοιώσεων), υποδηλώνοντας ότι ο φυσικός περιορισμός της διατροφής υποβάθμισε τη σοβαρότητα των αλλοιώσεων NE. Επίσης, ο φυσικός περιορισμός της διατροφής περιόρισε τη συχνότητα εμφάνισης των αλλοιώσεων NE, χωρίς ωστόσο η μείωση να είναι στατιστικά σημαντική ( $P > 0.10$ ).

Το ποσοστό των ορνιθίων και ο βαθμός αλλοιώσεων του ήπατος, όπως πρόέκυψε μετά από τη μακροσκοπική του εξέταση, παρουσιάζονται αναλυτικά στον **πίνακα 2.5.**

**Πίνακας 2.5.** Ποσοστό ορνιθίων και βαθμός μακροσκοπικών αλλοιώσεων ήπατος ανά ομάδα κατά τον πειραματισμό του φυσικού περιορισμού της διατροφής

ΒΑΘΜΟΣ	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ			
	N	SN	P	SP
0,00	52,1%	85,4%	33,3%	72,9%
1,00	29,2%	14,6%	39,6%	16,7%
2,00	18,8%	0,0%	27,1%	10,4%
<b>ΣΥΝΟΛΙΚΑ</b>	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%



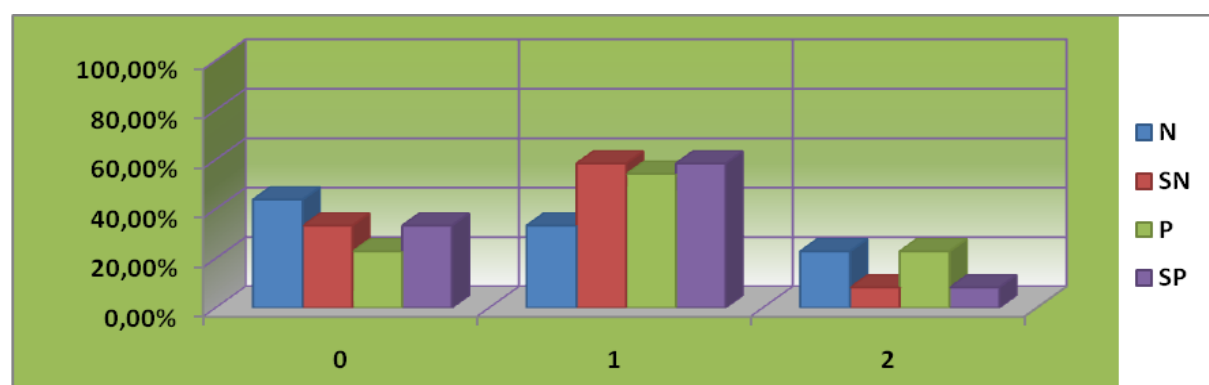
**Διάγραμμα 2.2.** Ποσοστό ορνιθίων και βαθμός μακροσκοπικών αλλοιώσεων ήπατος ανά ομάδα κατά τον πειραματισμό του φυσικού περιορισμού της διατροφής

Η μακροσκοπική εξέταση του ήπατος έδειξε ότι στην ομάδα SN το ποσοστό των ορνιθίων με φυσιολογικό ήπαρ ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) μεγαλύτερο και το ποσοστό των ορνιθίων με το μέγιστο βαθμό αλλοιώσεων (σκορ 2) ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) μικρότερο, συγκριτικά με τις υπόλοιπες ομάδες. Αντίθετα, η ομάδα P είχε σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) μικρότερο ποσοστό ορνιθίων με φυσιολογικό ήπαρ και σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) υψηλότερο ποσοστό ορνιθίων με το μέγιστο βαθμό αλλοιώσεων (σκορ 2), συγκριτικά με τις υπόλοιπες ομάδες. Ο φυσικός περιορισμός της διατροφής περιορίσε τόσο τη συχνότητα εμφάνισης όσο και τη σοβαρότητα των μακροσκοπικών αλλοιώσεων του ήπατος, ενώ η μόλυνση είχε ακριβώς την αντίθετη δράση.

Το ποσοστό των ορνιθίων και ο βαθμός αλλοιώσεων του μυώδους στομάχου, όπως προέκυψε μετά από τη μακροσκοπική του εξέταση, παρουσιάζονται αναλυτικά στον **πίνακα 2.6**.

**Πίνακας 2.6.** Ποσοστό ορνιθίων και βαθμός μακροσκοπικών αλλοιώσεων μυώδους στομάχου ανά ομάδα κατά τον πειραματισμό του φυσικού περιορισμού της διατροφής

ΒΑΘΜΟΣ	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ			
	N	SN	P	SP
0,00	43,8%	33,3%	22,9%	33,3%
1,00	33,3%	58,4%	54,2%	58,4%
2,00	22,9%	8,3%	22,9%	8,3%
<b>ΣΥΝΟΛΙΚΑ</b>	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%



**Διάγραμμα 2.3.** Ποσοστό ορνιθίων και βαθμός αλλοιώσεων μυώδους στομάχου ανά ομάδα κατά τον πειραματισμό του φυσικού περιορισμού της διατροφής

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων του βαθμού μακροσκοπικών αλλοιώσεων του μυώδους στομάχου προκύπτει ότι η ομάδα N είχε σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) υψηλότερο ποσοστό



## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ορνιθίων με βαθμό αλλοιώσεων 1 και σχετικά ( $P>0.10$ ) υψηλότερο ποσοστό ορνιθίων με φυσιολογικό μυώδη στόμαχο. Το ποσοστό των ορνιθίων με αλλοιώσεις μέγιστου βαθμού στην ομάδα SN ήταν σχετικά ( $P>0.10$ ) μικρότερο από αυτό της ομάδας N, υποδηλώνοντας ότι ο φυσικός περιορισμός της διατροφής περιόρισε τη σοβαρότητα των μακροσκοπικών αλλοιώσεων του μυώδους στομάχου.

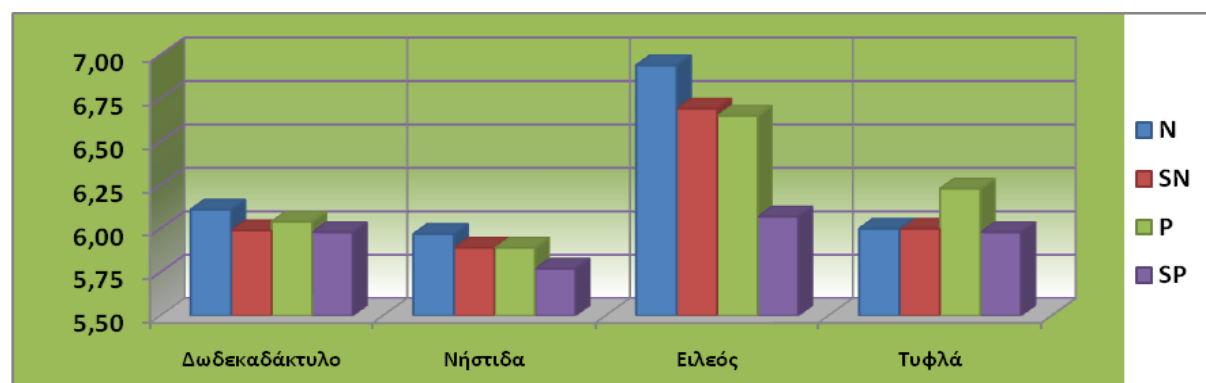
### 2.1.4 Μέτρηση pH εντερικού περιεχομένου

Τα αποτελέσματα της μέτρησης του pH από το περιεχόμενο των τμημάτων του εντέρου παρουσιάζονται στον **πίνακα 2.7**.

**Πίνακας 2.7.** pH του περιεχομένου στο δωδεκαδάκτυλο, τη νήστιδα, τον ειλέο και τα τυφλά ανά ομάδα κατά τον πειραματισμό του φυσικού περιορισμού της διατροφής ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ				
	N	SN	P	SP
Δωδεκαδάκτυλο	6,11±0,03 <sup>b</sup>	5,99±0,03 <sup>a</sup>	6,04±0,03 <sup>a</sup>	5,98±0,02 <sup>a</sup>
Νήστιδα	5,97±0,02 <sup>a</sup>	5,89±0,03 <sup>b</sup>	5,89±0,02 <sup>b</sup>	5,77±0,05 <sup>b</sup>
Ειλεός	6,94±0,05 <sup>a</sup>	6,69±0,08 <sup>b</sup>	6,65±0,07 <sup>b</sup>	6,07±0,12 <sup>c</sup>
Τυφλά	6,00±0,06 <sup>a</sup>	6,00±0,06 <sup>a</sup>	6,23±0,08 <sup>b</sup>	5,98±0,07 <sup>a</sup>

Σημείωση: <sup>a, b, c</sup> Μέσες τιμές στην ίδια γραμμή με διαφορετικό εκθέτη διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ).



**Διάγραμμα 2.4.** Μέση τιμή pH του περιεχομένου στο δωδεκαδάκτυλο, τη νήστιδα, τον ειλέο και τα τυφλά ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό του φυσικού περιορισμού της διατροφής

Η τιμή του pH του περιεχομένου του δωδεκαδακτύλου και της νήστιδας στην ομάδα N ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) υψηλότερη από ότι στις υπόλοιπες ομάδες, υποδηλώνοντας ότι τόσο ο φυσικός περιορισμός της διατροφής όσο και η μόλυνση είχαν άμεση επίδραση στη διαμόρφωση της τιμής του pH του περιεχομένου του δωδεκαδακτύλου και της νήστιδας, προκαλώντας τη μείωσή του.

Η τιμή του pH στο περιεχόμενο του ειλεού και των τυφλών παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, λόγω του μεγάλου μικροβιακού φορτίου και της έντονης μεταβολικής διεργασίας που παρατηρείται σε αυτά τα τμήματα του γαστρεντερικού σωλήνα. Ο φυσικός περιορισμός της διατροφής επηρέασε την τιμή του pH του περιεχομένου του ειλεού. Συγκεκριμένα, το pH του περιεχομένου του ειλεού στην ομάδα N ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) υψηλότερο από αυτό της ομάδας SN και στην ομάδα P σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) υψηλότερο από αυτό της ομάδας SP. Στα τυφλά η τιμή του pH ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) υψηλότερη μόνο στην ομάδα P.

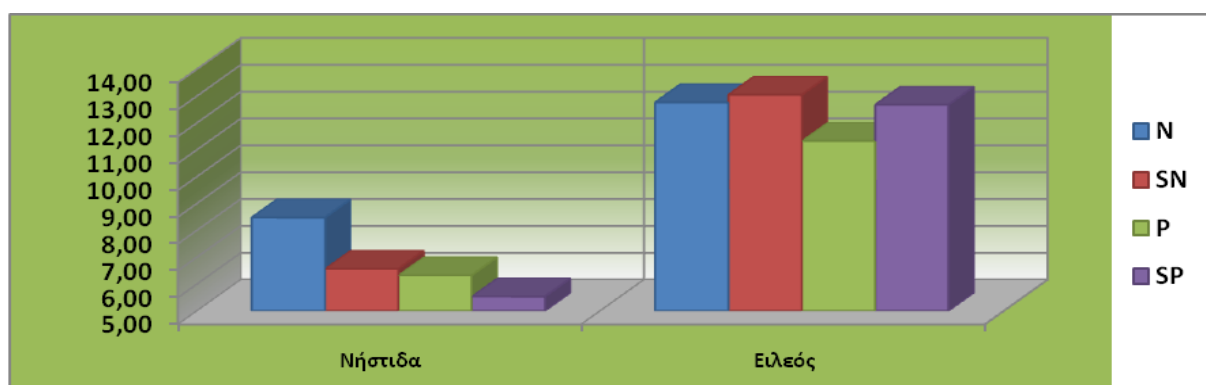
### 2.1.5 Μέτρηση ιξώδους εντερικού περιεχομένου

Τα αποτελέσματα της μέτρησης της τιμής του ιξώδους του περιεχομένου της νήστιδας και του ειλεού παρουσιάζονται στον **πίνακα 2.8**.

**Πίνακας 2.8.** Ιξώδες του περιεχομένου στη νήστιδα και τον ειλέο ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό του φυσικού περιορισμού της διατροφής ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ				
	N	SN	P	SP
Νήστιδα	8,48±0,55 <sup>a</sup>	6,57±0,48 <sup>b</sup>	6,33±0,42 <sup>b</sup>	5,54±0,44 <sup>c</sup>
Ειλέος	12,77±0,83 <sup>a</sup>	13,05±0,83 <sup>a</sup>	11,33±1,01 <sup>a</sup>	12,68±0,81 <sup>a</sup>

**Σημείωση:** <sup>a, b, c</sup> Μέσες τιμές στην ίδια γραμμή με διαφορετικό εκθέτη διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ).



**Διάγραμμα 2.5.** Μέση τιμή ιξώδους του περιεχομένου στη νήστιδα και τον ειλέο ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό του φυσικού περιορισμού της διατροφής

Η τιμή του ιξώδους του περιεχομένου της νήστιδας της ομάδας N ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) υψηλότερη από όλων των υπολοίπων ομάδων, υποδηλώνοντας ότι τόσο ο φυσικός περιορισμός της διατροφής όσο και η μόλυνση είχαν άμεση επίδραση, προκαλώντας τη μείωση του ιξώδους. Επίσης, μεταξύ των ομάδων που μολύνθηκαν υπήρχε διαφορά, με την ομάδα SP να έχει σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) μικρότερη τιμή ιξώδους.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

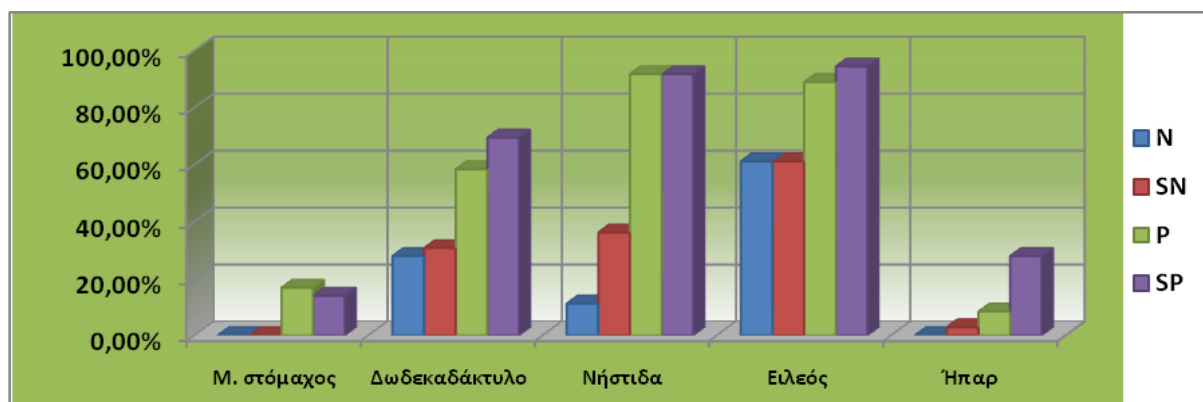
Η στατιστική αξιολόγηση των τιμών του ιξώδους του περιεχομένου του ειλεού δεν έδειξε σημαντική ( $P > 0.10$ ) διαφορά μεταξύ των ομάδων.

### 2.1.6 Βακτηριολογική εξέταση

Το ποσοστό των ορνιθίων στα τμήματα από όπου απομονώθηκε το *C. perfringens* παρουσιάζεται αναλυτικά στον **πίνακα 2.9**.

**Πίνακας 2.9.** Ποσοστό απομόνωσης και εντόπιση *C. perfringens* ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό του φυσικού περιορισμού της διατροφής

ΕΝΤΟΠΙΣΗ	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ			
	N	SN	P	SP
Μυώδης στόμαχος	0,0%	0,0%	16,7%	13,9%
Δωδεκαδάκτυλο	27,8%	30,6%	58,3%	69,4%
Νήστιδα	11,1%	36,1%	91,7%	91,7%
Ειλεός	61,1%	61,1%	88,9%	94,4%
Ήπαρ	0,0%	2,8%	8,3%	27,8%



**Διάγραμμα 2.6.** Ποσοστό απομόνωσης και εντόπιση *C. perfringens* ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό του φυσικού περιορισμού της διατροφής

Το ποσοστό των ορνιθίων από τα οποία απομονώθηκε το *C. perfringens* σε όλα τα τμήματα του γαστρεντερικού σωλήνα και το ήπαρ ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) υψηλότερο στις ομάδες που μολύνθηκαν (P και SP), συγκριτικά με τις ομάδες που δεν μολύνθηκαν (N και SN), υποδηλώνοντας την επιτυχία της μόλυνσης.

Το ποσοστό των ορνιθίων της ομάδας SN, από τα οποία απομονώθηκε το *C. perfringens* από τη νήστιδα, ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) υψηλότερο από αυτό της ομάδας N,

υποδηλώνοντας ότι ο φυσικός περιορισμός της διατροφής επηρέασε τη συχνότητα απομόνωσης του *C. perfringens* μόνο στη νήστιδα.

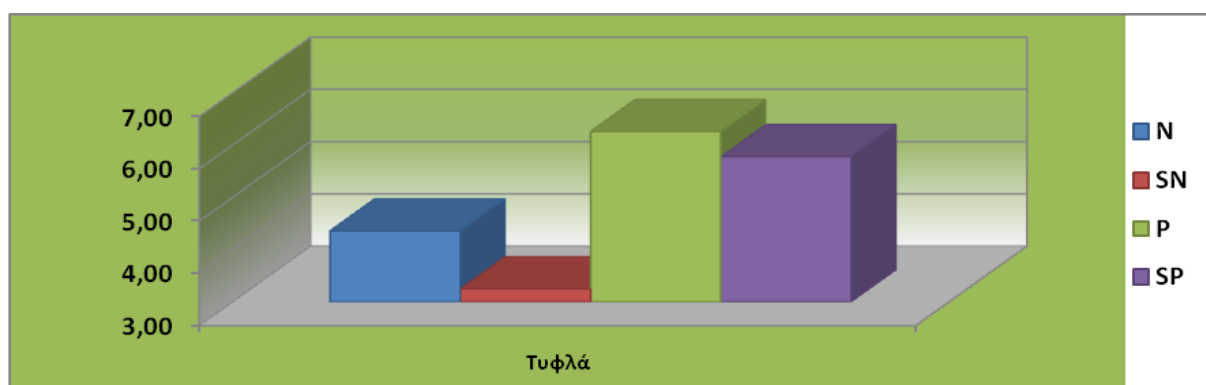
Το στέλεχος που απομονώθηκε από τις μη μολυσμένες ομάδες προερχόταν από τη φυσιολογική εντερική μικροχλωρίδα. Αυτό επιβεβαιώνεται και από το γεγονός ότι δεν ήταν ανθεκτικό στο αντιβιοτικό ριφαμπικίνη, όπως φάνηκε από την αδυναμία καλλιέργειας και ανάπτυξής του σε υπόστρωμα που περιείχε το αντιβιοτικό.

Τα αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού του *C. perfringens* στα τυφλά παρουσιάζονται στον πίνακα 2.10., εκφρασμένα σε cfu/g τυφλών μετά τη μετατροπή τους σε δεκαδικό λογάριθμο.

**Πίνακας 2.10.** Πληθυσμός ( $\log_{10}$ ) του *C. perfringens* εκφρασμένος σε cfu/g τυφλών ανά ομάδα κατά τον πειραματισμό του φυσικού περιορισμού της διατροφής ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ				
	N	SN	P	SP
$\text{Log}_{10} C. perfringens$	4,36 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>	3,25 $\pm$ 0,24 <sup>b</sup>	6,26 $\pm$ 0,19 <sup>c</sup>	5,78 $\pm$ 0,25 <sup>c</sup>

**Σημείωση:** <sup>a, b, c</sup> Μέσες τιμές με διαφορετικό εκθέτη διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ).



**Διάγραμμα 2.7.** Μέσος πληθυσμός ( $\log_{10}$ ) του *C. perfringens* εκφρασμένος σε cfu/g τυφλών ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό του φυσικού περιορισμού της διατροφής

Οι μολυσμένες ομάδες είχαν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) υψηλότερο πληθυσμό *C. perfringens* στα τυφλά, συγκριτικά με τις μη μολυσμένες ομάδες, υποδηλώνοντας την επιτυχία της μόλυνσης. Ο φυσικός περιορισμός της διατροφής είχε άμεση επίδραση στον πληθυσμό του *C. perfringens* στα τυφλά, προκαλώντας τη σημαντική ( $P \leq 0.05$ ) μείωσή του.

**2.2 Πειραματισμός αυξημένης φόρτισης δαπέδου****2.2.1 Σωματικό βάρος και δείκτης μετατρεψιμότητας της τροφής**

Στον **πίνακα 2.11**, παρουσιάζεται το ΣΒ ανά ορνίθιο όλων των ομάδων πριν και μετά τη μόλυνση. Οι τιμές του ΔΜΤ, πριν και μετά την εφαρμογή των πειραματικών χειρισμών, παρουσιάζονται στον **πίνακα 2.12**.

**Πίνακας 2.11.** ΣΒ (g) ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό της αυξημένης φόρτισης δαπέδου ανάλογα με την ηλικία

ΗΛΙΚΙΑ	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ			
	N	DN	P	DP
1 <sup>η</sup> ημέρα	45	40	45	40
10 <sup>η</sup> ημέρα	120	110	120	110
16 <sup>η</sup> ημέρα	340	370	340	350
17 <sup>η</sup> ημέρα	380	370	365	350
21 <sup>η</sup> ημέρα	650	660	605	620

**Πίνακας 2.12.** ΔΜΤ ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό της αυξημένης φόρτισης δαπέδου

ΔΙΑΣΤΗΜΑ	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ			
	N	DN	P	DP
10 <sup>η</sup> -16 <sup>η</sup> ημέρα	2,76	1,70	3,40	2,01
17 <sup>η</sup> -21 <sup>η</sup> ημέρα	2,25	1,60	2,33	1,63

Την 1<sup>η</sup> και την 10<sup>η</sup> ημέρα της ζωής των ορνιθίων, το ΣΒ ανά ορνίθιο όλων των ομάδων δεν παρουσίαζε διαφορές. Ωστόσο, από τη 16η ημέρα άρχιζε να διαφαίνεται διαφορά του ΣΒ μεταξύ των πειραματικών ομάδων.

Τη 17<sup>η</sup> και την 21<sup>η</sup> ημέρα της ζωής των ορνιθίων, μετά τη μικτή μόλυνση, το ΣΒ ανά ορνίθιο διέφερε μεταξύ των ομάδων. Συγκεκριμένα, οι ομάδες οι οποίες μολύνθηκαν (P και DP) παρουσίαζαν έντονη καθυστέρηση στην ανάπτυξη και μείωση του ΣΒ, συγκριτικά με τις ομάδες που δεν μολύνθηκαν (N και DN), ανεξάρτητα από τη φόρτιση δαπέδου. Η φόρτιση δαπέδου δεν φαίνεται να είχε άμεση επίδραση στο ΣΒ μετά τη 16<sup>η</sup> ημέρα της ζωής των ορνιθίων.

Ο ΔΜΤ, ιδιαίτερα πριν τη μόλυνση, ήταν πολύ υψηλός, με εξαίρεση τις ομάδες DN και DP, στις οποίες η φόρτιση δαπέδου ήταν αυξημένη. Η μετάβαση από το σιτηρέσιο B

(10<sup>η</sup>-16<sup>η</sup> ημέρα) στο σιτηρέσιο Γ (17<sup>η</sup>-21<sup>η</sup> ημέρα) είχε άμεση επίδραση στο ΔΜΤ όλων των ομάδων. Συγκεκριμένα, η αντικατάσταση του σιτηρεσίου Β, το οποίο περιείχε ως πηγή πρωτεϊνών το σογιάλευρο, από το σιτηρέσιο Γ, το οποίο περιείχε ως πηγή πρωτεϊνών το ιχθυάλευρο βελτίωσε το ΔΜΤ. Ο ΔΜΤ της ομάδας Ν ήταν μεγαλύτερος από της ομάδας DN και της ομάδας Ρ από της ομάδας DP, υποδηλώνοντας ότι η αύξηση της φόρτισης δαπέδου βελτίωσε το ΔΜΤ. Η μόλυνση των ορνιθίων με *C. perfringens* και *Eimeria* spp. δεν φαίνεται να είχε άμεση επίδραση στο ΔΜΤ.

### **2.2.2 Παρασιτολογική εξέταση**

Τα αποτελέσματα της παρασιτολογικής εξέτασης των κοπράνων που διενεργήθηκε την 9<sup>η</sup>, τη 16<sup>η</sup> και την 20<sup>η</sup> ημέρα της ζωής των ορνιθίων στις ομάδες Ν και DN ήταν αρνητικά, υποδηλώνοντας την απουσία επιμόλυνσης με *Eimeria* spp. Στις ομάδες Ρ και DP τα αποτελέσματα της εξέτασης ήταν αρνητικά την 9<sup>η</sup> και τη 16<sup>η</sup> ημέρα της ζωής των ορνιθίων και θετικά την 20<sup>η</sup> ημέρα, επιβεβαιώνοντας την επιτυχία της μόλυνσης με *Eimeria* spp. που διεξήχθη τη 18<sup>η</sup> ημέρα. Επίσης, τα αποτελέσματα της μικροσκοπικής εξέτασης των επιχρισμάτων από τον εντερικό βλεννογόνο και το περιεχόμενο ήταν αρνητικά για τις ομάδες Ν και DN και θετικά για τις ομάδες Ρ και DP.

### **2.2.3 Μακροσκοπική εξέταση**

Το ποσοστό των ορνιθίων που εκδήλωσαν αλλοιώσεις ΝΕ και ο μ.ο. του βαθμού αλλοιώσεων, όπως πρόεκυψε μετά από τη μακροσκοπική εξέταση του εντέρου, παρουσιάζονται αναλυτικά στους πίνακες **2.13.** και **2.14.**

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

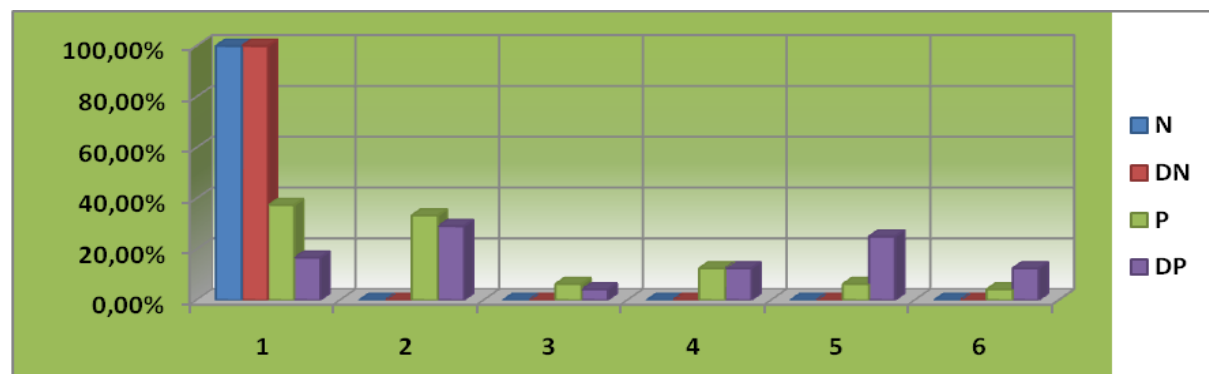
**Πίνακας 2.13.** Ποσοστό ορνιθίων και βαθμός αλλοιώσεων NE ανά ομάδα κατά τον πειραματισμό της αυξημένης φόρτισης δαπέδου

ΒΑΘΜΟΣ	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ			
	N	DN	P	DP
1,00	100,0%	100,0%	37,4%	16,7%
2,00	0,0%	0,0%	33,3%	29,1%
3,00	0,0%	0,0%	6,3%	4,2%
4,00	0,0%	0,0%	12,5%	12,5%
5,00	0,0%	0,0%	6,3%	25,0%
6,00	0,0%	0,0%	4,2%	12,5%
<b>ΣΥΝΟΛΙΚΑ</b>	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

**Πίνακας 2.14.** Μέσος όρος βαθμού αλλοιώσεων NE στο έντερο ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό της αυξημένης φόρτισης δαπέδου ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )

Μ.Ο	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ			
	N	DN	P	DP
	1,00±0,00 <sup>a</sup>	1,00±0,00 <sup>a</sup>	2,29±0,21 <sup>b</sup>	3,38±0,26 <sup>c</sup>

**Σημείωση:** <sup>a, b, c</sup> Μέσες τιμές με διαφορετικό εκθέτη διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ).



**Διάγραμμα 2.8.** Ποσοστό ορνιθίων και βαθμός αλλοιώσεων NE ανά ομάδα κατά τον πειραματισμό της αυξημένης φόρτισης δαπέδου

Ο μ.ο. του βαθμού αλλοιώσεων NE των ορνιθίων των ομάδων N και DN ήταν 1, υποδηλώνοντας ότι κανένα ορνίθιο δεν εμφάνισε αλλοιώσεις NE. Αυτό είναι φυσιολογικό και αναμενόμενο γιατί τα ορνίθια δεν μολύνθηκαν. Αντίθετα, ο μ.ο. του βαθμού αλλοιώσεων NE των ομάδων P και DP ήταν μεγαλύτερος από 1, υποδηλώνοντας ότι στα ορνίθια των ομάδων εκδηλώθηκαν αλλοιώσεις NE στον εντερικό βλεννογόνο.

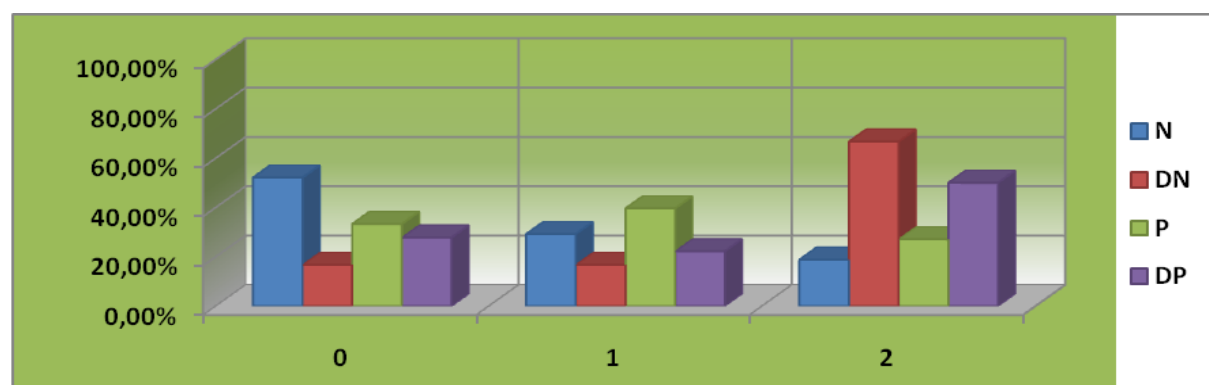
Μεταξύ των πειραματικών ομάδων υπήρχε στατιστική διαφορά. Συγκεκριμένα, ο μ.ο. του βαθμού αλλοιώσεων NE των μη μολυσμένων ομάδων ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) μικρότερος από το μ.ο. των μολυσμένων ομάδων. Επίσης, μεταξύ των μολυσμένων ομάδων, ο μ.ο. του βαθμού αλλοιώσεων NE της ομάδας DP ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) μεγαλύτερος από της ομάδας P.

Από την ποιοτική στατιστική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και τη συγκριτική μελέτη μεταξύ των ομάδων P και DP προκύπτει ότι η αυξημένη φόρτιση δαπέδου προκάλεσε την εκδήλωση εντονότερων αλλοιώσεων NE και σε μεγαλύτερο αριθμό ορνιθίων μετά από μικτή μόλυνση με *C. perfringens* και *Eimeria* spp., συγκριτικά με την κανονική φόρτιση δαπέδου. Συγκεκριμένα, στην ομάδα DP το ποσοστό των ορνιθίων χωρίς αλλοιώσεις NE ήταν σημαντικά μικρότερο ( $P \leq 0.05$ ) και το ποσοστό των ορνιθίων με βαθμό αλλοιώσεων 5 ήταν σημαντικά υψηλότερο ( $P \leq 0.05$ ), ενώ στην ομάδα P παρατηρήθηκε η αντίθετη εικόνα.

Το ποσοστό των ορνιθίων και ο βαθμός αλλοιώσεων του ήπατος, όπως πρόέκυψε μετά από τη μακροσκοπική του εξέταση, παρουσιάζονται αναλυτικά στον **πίνακα 2.15**.

**Πίνακας 2.15.** Ποσοστό ορνιθίων και βαθμός μακροσκοπικών αλλοιώσεων ήπατος ανά ομάδα κατά τον πειραματισμό της αυξημένης φόρτισης δαπέδου

ΒΑΘΜΟΣ	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ			
	N	DN	P	DP
0,00	52,1%	16,7%	33,3%	27,8%
1,00	29,2%	16,7%	39,6%	22,2%
2,00	18,8%	66,7%	27,1%	50,0%
<b>ΣΥΝΟΛΙΚΑ</b>	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%



**Διάγραμμα 2.9.** Ποσοστό ορνιθίων και βαθμός μακροσκοπικών αλλοιώσεων ήπατος ανά ομάδα κατά τον πειραματισμό της αυξημένης φόρτισης δαπέδου



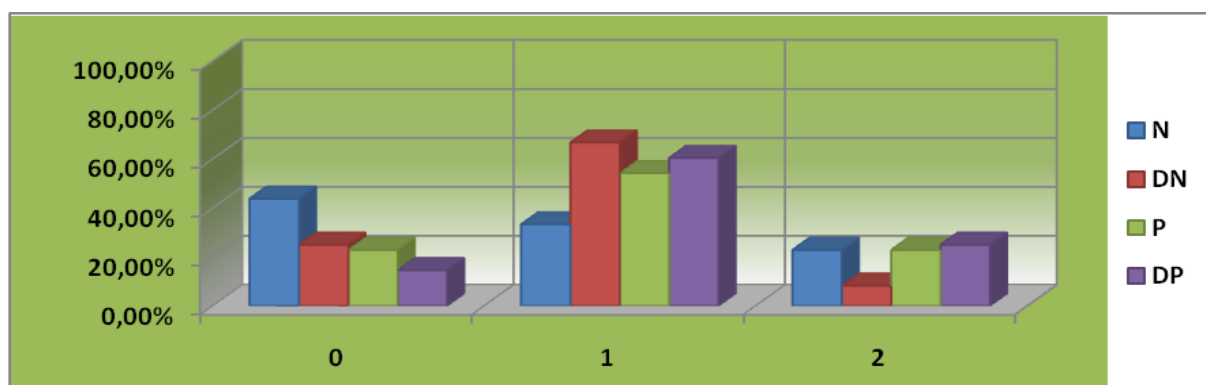
## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Από τη μελέτη των αποτελεσμάτων προκύπτει ότι η αυξημένη φόρτιση δαπέδου επηρέασε τόσο τη συχνότητα εμφάνισης όσο και τη σοβαρότητα των μακροσκοπικών αλλοιώσεων στο ήπαρ, ανεξάρτητα από τη μόλυνση. Συγκεκριμένα, η ομάδα DN εμφάνιζε σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) μικρότερο ποσοστό ορνιθίων χωρίς μακροσκοπικές αλλοιώσεις στο ήπαρ και σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) υψηλότερο ποσοστό ορνιθίων με το μέγιστο βαθμό αλλοιώσεων, ενώ στην ομάδα N είχαμε αντίθετη εικόνα.

Το ποσοστό των ορνιθίων και ο βαθμός αλλοιώσεων του μυώδους στομάχου, όπως πρόεκυψε μετά από τη μακροσκοπική του εξέταση, παρουσιάζονται αναλυτικά στον **πίνακα 2.16**.

**Πίνακας 2.16.** Ποσοστό ορνιθίων και βαθμός μακροσκοπικών αλλοιώσεων μυώδους στομάχου ανά ομάδα κατά τον πειραματισμό της αυξημένης φόρτισης δαπέδου

ΒΑΘΜΟΣ	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ			
	N	DN	P	DP
0,00	43,8%	25,0%	22,9%	14,6%
1,00	33,3%	66,7%	54,2%	60,4%
2,00	22,9%	8,3%	22,9%	25,0%
<b>ΣΥΝΟΛΙΚΑ</b>	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%



**Διάγραμμα 2.10.** Ποσοστό ορνιθίων και βαθμός αλλοιώσεων μυώδους στομάχου ανά ομάδα κατά τον πειραματισμό της αυξημένης φόρτισης δαπέδου

Η ομάδα N που χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας είχε σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) υψηλότερο ποσοστό ορνιθίων με φυσιολογικό μυώδη στόμαχο και σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) χαμηλότερο ποσοστό ορνιθίων με ήπιες αλλοιώσεις (σکور 1), υποδηλώνοντας ότι τόσο η

μικτή μόλυνση όσο και η αύξηση της φόρτισης δαπέδου επηρέασαν την πρόκληση μακροσκοπικών αλλοιώσεων στο μυώδη στόμαχο.

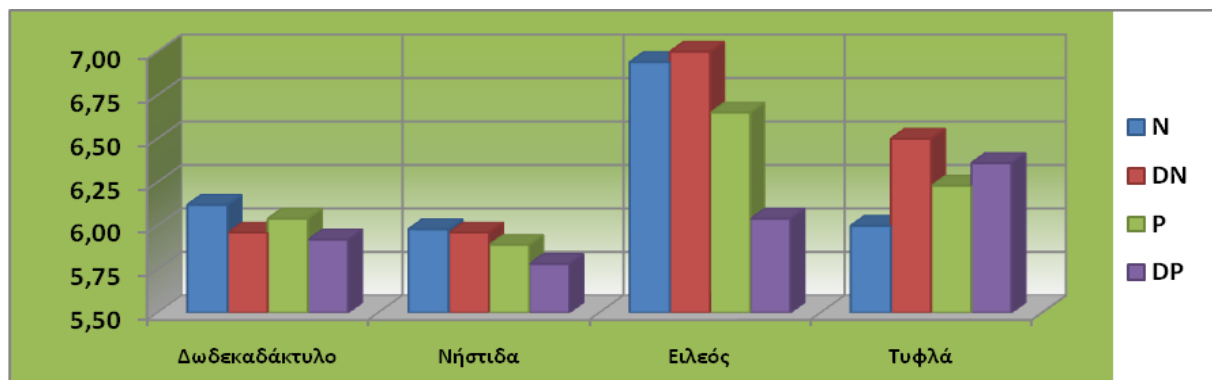
#### 2.2.4 Μέτρηση pH εντερικού περιεχομένου

Τα αποτελέσματα της μέτρησης του pH από το περιεχόμενο των τμημάτων του εντέρου παρουσιάζονται στον **πίνακα 2.17**.

**Πίνακας 2.17.** pH του περιεχομένου στο δωδεκαδάκτυλο, τη νήστιδα, τον ειλέο και τα τυφλά ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό της αυξημένης φόρτισης δαπέδου ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ				
	N	DN	P	DP
Δωδεκαδάκτυλο	6,12±0,03 <sup>a</sup>	5,96±0,03 <sup>bc</sup>	6,04±0,03 <sup>ab</sup>	5,92±0,03 <sup>c</sup>
Νήστιδα	5,98±0,02 <sup>a</sup>	5,96±0,02 <sup>a</sup>	5,89±0,02 <sup>b</sup>	5,78±0,02 <sup>c</sup>
Ειλέος	6,94±0,05 <sup>a</sup>	7,06±0,05 <sup>a</sup>	6,65±0,07 <sup>b</sup>	6,04±0,07 <sup>c</sup>
Τυφλά	6,00±0,06 <sup>a</sup>	6,50±0,05 <sup>b</sup>	6,23±0,08 <sup>c</sup>	6,36±0,06 <sup>c</sup>

**Σημείωση:** <sup>a, b, c</sup> Μέσες τιμές στην ίδια γραμμή με διαφορετικό εκθέτη διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ).



**Διάγραμμα 2.11.** Μέση τιμή του pH του περιεχομένου στο δωδεκαδάκτυλο, τη νήστιδα, τον ειλέο και τα τυφλά ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό της αυξημένης φόρτισης δαπέδου

Η αυξημένη φόρτιση προκάλεσε σημαντική ( $P \leq 0.05$ ) μείωση του pH του περιεχομένου του δωδεκαδακτύλου και αύξηση του pH του περιεχομένου των τυφλών.

Η μόλυνση των ορνιθίων με *C. perfringens* και *Eimeria* spp. προκάλεσε σημαντική ( $P \leq 0.05$ ) μείωση της τιμής του pH του περιεχομένου της νήστιδας και του ειλεού και σημαντική ( $P \leq 0.05$ ) αύξηση του pH των τυφλών. Μεταξύ των μολυσμένων ομάδων, ο συνδυασμός της μόλυνσης με την αυξημένη φόρτιση δαπέδου προκάλεσε σημαντική ( $P \leq 0.05$ ) μείωση του pH στο περιεχόμενο του δωδεκαδακτύλου, της νήστιδας και του ειλεού.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Επίσης, το pH του περιεχομένου των τυφλών της ομάδας N ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) χαμηλότερο, συγκριτικά με των υπόλοιπων ομάδων, υποδηλώνοντας ότι τόσο η αυξημένη φόρτιση όσο και η μικτή μόλυνση επηρέασαν το pH του περιεχομένου των τυφλών, προκαλώντας την αύξησή του.

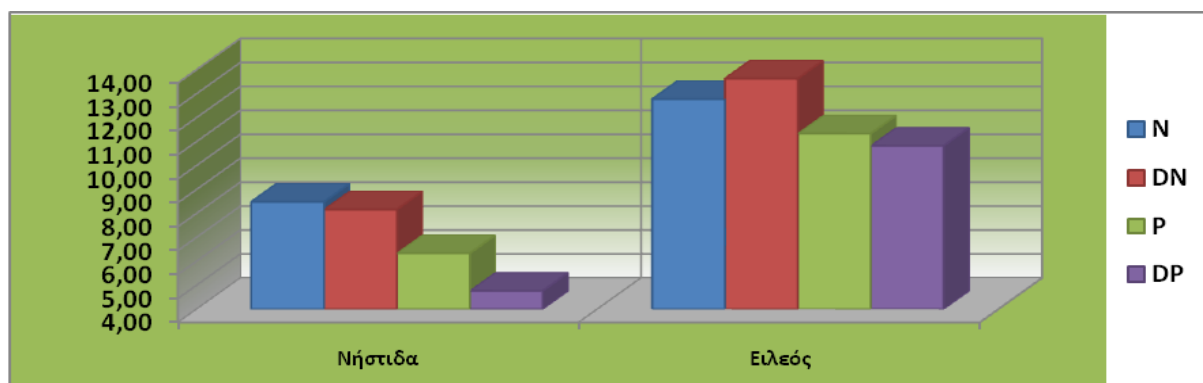
### 2.2.5 Μέτρηση ιξώδους εντερικού περιεχομένου

Τα αποτελέσματα της μέτρησης της τιμής του ιξώδους του περιεχομένου της νήστιδας και του ειλεού παρουσιάζονται στον **πίνακα 2.18**.

**Πίνακας 2.18.** Ιξώδες του περιεχομένου στη νήστιδα και τον ειλέο ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό της αυξημένης φόρτισης δαπέδου ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ				
	N	DN	P	DP
Νήστιδα	8,48±0,55 <sup>a</sup>	8,16±0,37 <sup>a</sup>	6,33±0,42 <sup>b</sup>	4,76±0,48 <sup>c</sup>
Ειλεός	12,77±0,83 <sup>a</sup>	13,63±1,16 <sup>a</sup>	11,33±1,01 <sup>a</sup>	10,82±1,04 <sup>a</sup>

**Σημείωση:** <sup>a, b, c</sup> Μέσες τιμές στην ίδια γραμμή με διαφορετικό εκθέτη διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ).



**Διάγραμμα 2.12.** Μέση τιμή του ιξώδους του περιεχομένου στη νήστιδα και τον ειλέο ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό της αυξημένης φόρτισης δαπέδου

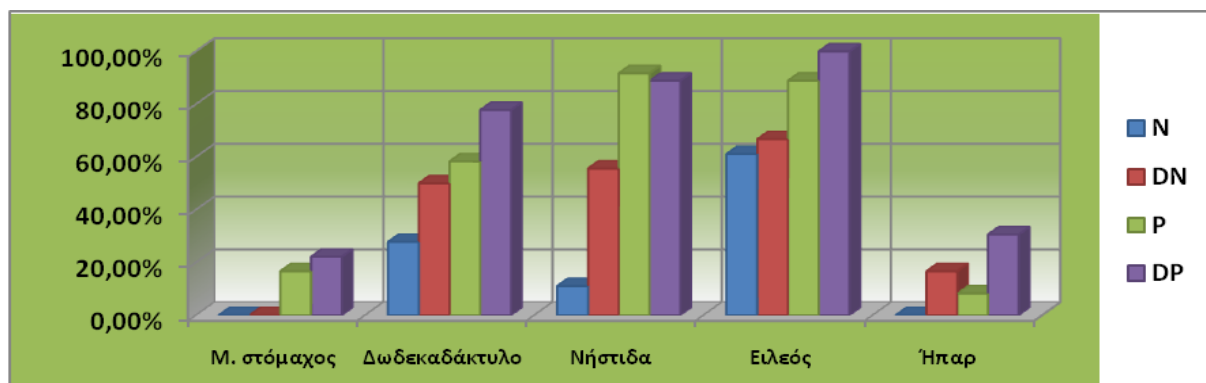
Οι πειραματικοί χειρισμοί είχαν σημαντική ( $P \leq 0.05$ ) επίδραση στην τιμή του ιξώδους του περιεχομένου της νήστιδας, αλλά όχι του ειλεού ( $P > 0.10$ ). Συγκεκριμένα, η μόλυνση των ορνιθίων προκάλεσε σημαντική ( $P \leq 0.05$ ) μείωση του ιξώδους του περιεχομένου της νήστιδας και σχετική ( $P > 0.10$ ) μείωση του ιξώδους του περιεχομένου του ειλεού. Παρόλο που η αύξηση της φόρτισης δαπέδου δεν είχε σημαντική ( $P > 0.10$ ) επίδραση στη διαμόρφωση του ιξώδους, ο συνδυασμός της με τη μικτή μόλυνση προκάλεσε σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) μεγαλύτερη μείωση του ιξώδους της νήστιδας.

### 2.2.6 Βακτηριολογική εξέταση

Το ποσοστό των ορνιθίων στα τμήματα από τα οποία απομονώθηκε το *C. perfringens* παρουσιάζεται αναλυτικά στον **πίνακα 2.19**.

**Πίνακας 2.19.** Ποσοστό απομόνωσης και εντόπιση *C. perfringens* ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό της αυξημένης φόρτισης δαπέδου

ΕΝΤΟΠΙΣΗ	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ			
	N	DN	P	DP
Μυώδης στόμαχος	0,0%	0,0%	16,7%	22,2%
Δωδεκαδάκτυλο	27,8%	50,0%	58,3%	77,8%
Νήστιδα	11,1%	55,6%	91,7%	88,9%
Ειλεός	61,1%	66,7%	88,9%	100,0%
Ήπαρ	0,0%	16,7%	8,3%	30,6%



**Διάγραμμα 2.13.** Ποσοστό απομόνωσης και εντόπιση *C. perfringens* ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό της αυξημένης φόρτισης δαπέδου

Το ποσοστό των ορνιθίων από τα οποία απομονώθηκε το *C. perfringens* ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) μικρότερο στην ομάδα N, υποδηλώνοντας ότι η μόλυνση των ορνιθίων με *C. perfringens* και *Eimeria* spp. επηρέασε τη συχνότητα απομόνωσης *C. perfringens* από το γαστρεντερικό σωλήνα. Παρομοίως, η αύξηση της φόρτισης δαπέδου είχε άμεση επίδραση στη συχνότητα απομόνωσης του *C. perfringens* από το δωδεκαδάκτυλο, τη νήστιδα και το ήπαρ. Συγκεκριμένα, το ποσοστό των ορνιθίων από τα οποία απομονώθηκε το *C. perfringens* ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) υψηλότερο στις ομάδες των ορνιθίων που εκτρέφονταν σε αυξημένη φόρτιση, συγκριτικά με τις ομάδες των ορνιθίων που εκτρέφονταν σε φυσιολογική φόρτιση.

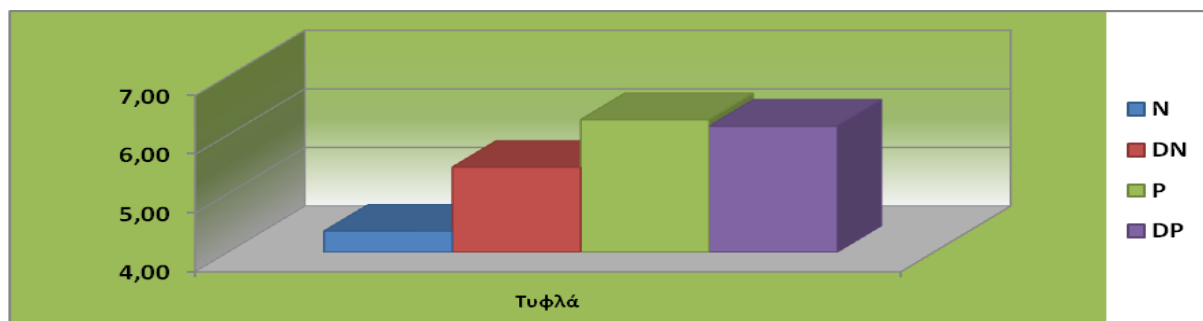
## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού του *C. perfringens* στα τυφλά παρουσιάζονται στον **πίνακα 2.20.**, εκφρασμένα σε cfu/g τυφλών μετά τη μετατροπή τους σε δεκαδικό λογάριθμο.

**Πίνακας 2.20.** Πληθυσμός ( $\log_{10}$ ) του *C. perfringens* εκφρασμένος σε cfu/g τυφλών ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό της αυξημένης φόρτισης δαπέδου ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ				
	N	DN	P	DP
$\text{Log}_{10} C. perfringens$	4,36±0,17 <sup>a</sup>	5,45±0,19 <sup>b</sup>	6,26±0,17 <sup>c</sup>	6,15±0,23 <sup>c</sup>

**Σημείωση:** <sup>a, b, c</sup> Μέσες τιμές με διαφορετικό εκθέτη διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ).



**Διάγραμμα 2.14.** Μέσος πληθυσμός ( $\log_{10}$ ) του *C. perfringens* εκφρασμένος σε cfu/g τυφλών ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό της αυξημένης φόρτισης δαπέδου

Από τη συγκριτική μελέτη των αποτελεσμάτων του ποσοτικού προσδιορισμού του *C. perfringens* στα τυφλά προκύπτει ότι τόσο η αυξημένη φόρτιση δαπέδου όσο και η μικτή μόλυνση με *C. perfringens* και *Eimeria* spp. είχαν σημαντική ( $P \leq 0.05$ ) επίδραση στον πληθυσμό του *C. perfringens* στα τυφλά, προκαλώντας την αύξηση του πληθυσμού του. Συγκεκριμένα, τα ορνίθια των ομάδων P και DP είχαν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) υψηλότερο πληθυσμό *C. perfringens* στα τυφλά, από τα ορνίθια της ομάδας N. Επίσης, ο πληθυσμός του *C. perfringens* στα τυφλά των ορνιθίων της ομάδας DN ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) υψηλότερος από της ομάδας N.

**2.3 Πειραματισμός θερμικής καταπόνησης****2.3.1 Σωματικό βάρος και δείκτης μετατρεψιμότητας της τροφής**

Στον **πίνακα 2.21**, παρουσιάζεται το ΣΒ ανά ορνίθιο όλων των ομάδων πριν και μετά τη μόλυνση και τη θερμική καταπόνηση. Οι τιμές του ΔΜΤ, πριν και μετά την εφαρμογή των πειραματικών χειρισμών, παρουσιάζονται στον **πίνακα 2.22**.

**Πίνακας 2.21.** ΣΒ (g) ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό της θερμικής καταπόνησης ανάλογα με την ηλικία

ΗΛΙΚΙΑ	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ			
	N	HN	P	HP
1 <sup>η</sup> ημέρα	45	45	45	50
10 <sup>η</sup> ημέρα	120	115	120	125
16 <sup>η</sup> ημέρα	340	320	340	330
17 <sup>η</sup> ημέρα	380	360	365	370
21 <sup>η</sup> ημέρα	650	620	605	560

**Πίνακας 2.22.** ΔΜΤ ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό της θερμικής καταπόνησης

ΔΙΑΣΤΗΜΑ	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ			
	N	HN	P	HP
10 <sup>η</sup> -16 <sup>η</sup> ημέρα	2,76	3,00	3,40	3,20
17 <sup>η</sup> -21 <sup>η</sup> ημέρα	2,25	2,10	2,33	2,60

Την 1<sup>η</sup>, την 10<sup>η</sup> και τη 16<sup>η</sup> ημέρα της ζωής των ορνιθίων, δηλαδή πριν τη μόλυνση και τη θερμική καταπόνηση, το ΣΒ ανά ορνίθιο όλων των ομάδων δεν διέφερε. Τη 17<sup>η</sup> ημέρα της ζωής των ορνιθίων, πριν τη μόλυνση και μετά τη θερμική καταπόνηση, το ΣΒ ανά ορνίθιο επίσης δεν διέφερε, επειδή η διάρκεια της καταπόνησης ήταν μικρή.

Μετά το πέρας της μόλυνσης και της θερμικής καταπόνησης, το ΣΒ ανά ορνίθιο μεταξύ των ομάδων διέφερε. Το υψηλότερο ΣΒ παρατηρήθηκε στην ομάδα N, η οποία δεν υπέστη κανέναν πειραματικό χειρισμό, ενώ το χαμηλότερο ΣΒ παρατηρήθηκε στην ομάδα HP, η οποία υπέστη μόλυνση και θερμική καταπόνηση.

Τόσο η μόλυνση όσο και η θερμική καταπόνηση είχαν άμεση επίδραση στο ΣΒ των ορνιθίων. Συγκεκριμένα, την 21<sup>η</sup> ημέρα τα ορνίθια μολυσμένων ομάδων είχαν μικρότερο ΣΒ από τα ορνίθια των ομάδων που δεν μολύνθηκαν. Επίσης, το ΣΒ των πτηνών των ομάδων

που υπέστησαν θερμική καταπόνηση ήταν μικρότερο από αυτό των ομάδων, όπου η θερμοκρασία θαλάμου ήταν φυσιολογική, υποδηλώνοντας ότι η θερμική καταπόνηση προκάλεσε μείωση του ΣΒ.

Ο ΔΜΤ ήταν πολύ υψηλός σε όλες τις ομάδες, ιδιαίτερα πριν τους πειραματικούς χειρισμούς. Η μετάβαση από το σιτηρέσιο Β στο σιτηρέσιο Γ, το οποίο περιείχε ως πηγή πρωτεϊνών το ιχθυάλευρο αντί της σόγιας, βελτίωσε το ΔΜΤ. Η μόλυνση και η θερμική καταπόνηση δεν επηρέασαν το ΔΜΤ. Ωστόσο, ο συνδυασμός της μόλυνσης με τη θερμική καταπόνηση προκάλεσε την αύξησή του.

### **2.3.2 Παρασιτολογική εξέταση**

Τα αποτελέσματα της παρασιτολογικής εξέτασης των κοπράνων που διενεργήθηκε την 9<sup>η</sup>, τη 16<sup>η</sup> και την 20<sup>η</sup> ημέρα της ζωής των ορνιθίων στις ομάδες Ν και ΗΝ ήταν αρνητικά, υποδηλώνοντας την απουσία επιμόλυνσης με *Eimeria* spp. Στις ομάδες Ρ και ΗΡ, τα αποτελέσματα της εξέτασης ήταν αρνητικά την 9<sup>η</sup> και τη 16<sup>η</sup> ημέρα της ζωής των ορνιθίων και θετικά την 20<sup>η</sup> ημέρα, επιβεβαιώνοντας την επιτυχία της μόλυνσης με *Eimeria* spp. που διεξήχθη τη 18<sup>η</sup> ημέρα. Επίσης, τα αποτελέσματα της μικροσκοπικής εξέτασης των επιχρισμάτων από τον εντερικό βλεννογόνο και το περιεχόμενο ήταν αρνητικά για τις ομάδες Ν και ΗΝ και θετικά για τις ομάδες Ρ και ΗΡ.

### **2.3.3 Μακροσκοπική εξέταση**

Το ποσοστό των ορνιθίων που εκδήλωσαν αλλοιώσεις ΝΕ και ο μ.ο. του βαθμού αλλοιώσεων, όπως πρόεκυψε μετά από τη μακροσκοπική εξέταση του εντέρου, παρουσιάζονται αναλυτικά στους πίνακες **2.23.** και **2.24.**

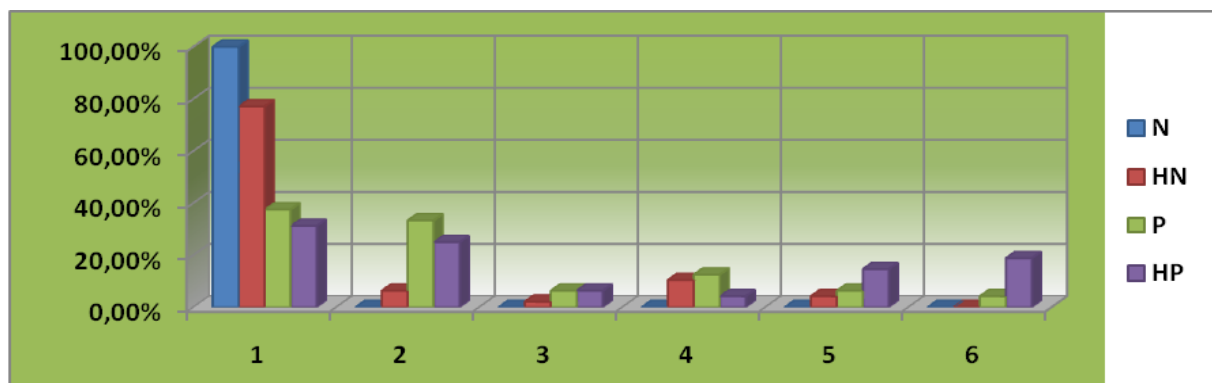
**Πίνακας 2.23.** Ποσοστό ορνιθίων και βαθμός αλλοιώσεων NE ανά ομάδα κατά τον πειραματισμό της θερμικής καταπόνησης

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ				
ΒΑΘΜΟΣ	N	HN	P	HP
1,00	100,0%	77,1%	37,5%	31,2%
2,00	0,0%	6,3%	33,3%	25,0%
3,00	0,0%	2,1%	6,3%	6,3%
4,00	0,0%	10,4%	12,5%	4,2%
5,00	0,0%	4,2%	6,3%	14,6%
6,00	0,0%	0,0%	4,2%	18,8%
<b>ΣΥΝΟΛΙΚΑ</b>	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

**Πίνακας 2.24.** Μέσος όρος βαθμού αλλοιώσεων NE ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό της θερμικής καταπόνησης ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ				
	N	HN	P	HP
<b>Μ.Ο</b>	1,00±0,00 <sup>a</sup>	1,58±0,17 <sup>b</sup>	2,29±0,2 <sup>c</sup>	3,02±0,28 <sup>d</sup>

**Σημείωση:** <sup>a, b, c, d</sup> Μέσες τιμές με διαφορετικό εκθέτη διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ).



**Διάγραμμα 2.15.** Ποσοστό ορνιθίων και βαθμός αλλοιώσεων NE ανά ομάδα κατά τον πειραματισμό της θερμικής καταπόνησης

Ο μ.ο. του βαθμού αλλοιώσεων NE των ορνιθίων της ομάδας N ήταν 1 σε όλες τις δειγματοληψίες, που σημαίνει ότι κανένα ορνίθιο δεν εμφάνισε αλλοιώσεις NE. Αντίθετα, ο μ.ο. του βαθμού αλλοιώσεων NE των ορνιθίων της ομάδας HN ήταν μεγαλύτερος από 1, υποδηλώνοντας ότι ορισμένα ορνίθια της ομάδας εμφάνισαν αλλοιώσεις NE, παρά το γεγονός ότι δεν μολύνθηκαν. Ο μ.ο. του βαθμού αλλοιώσεων NE των ορνιθίων της ομάδας HN ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) μεγαλύτερος από εκείνον της ομάδας N.



## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

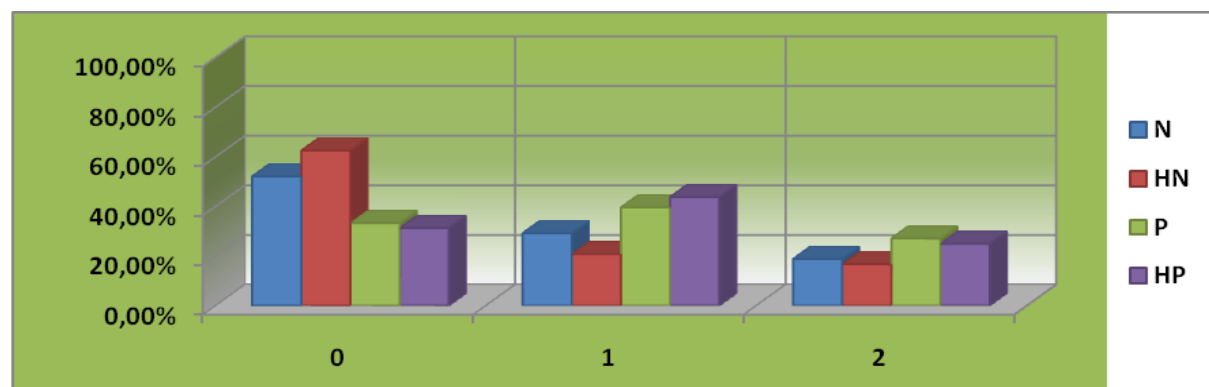
Ο μ.ο. του βαθμού αλλοιώσεων NE των ομάδων P και HP ήταν μεγαλύτερος από 1, που σημαίνει ότι στα ορνίθια των ομάδων εκδηλώθηκαν αλλοιώσεις NE στον εντερικό βλεννογόνο. Ο μ.ο. του βαθμού αλλοιώσεων NE των ορνιθίων της ομάδας HP ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) μεγαλύτερος από εκείνον της ομάδας P.

Πιο αναλυτικά, όπως φαίνεται και από τα στοιχεία του **πίνακα 2.23**, η θερμική καταπόνηση προκάλεσε την εκδήλωση αλλοιώσεων NE στα ορνίθια της ομάδας HN, παρά το γεγονός ότι αυτά δεν μολύνθηκαν, ενώ αντίθετα κανένα ορνίθιο της ομάδας N δεν εμφάνισε αλλοιώσεις. Η θερμική καταπόνηση των ορνιθίων, σε συνδυασμό με τη μόλυνση με *C. perfringens* και *Eimeria* spp., δεν επηρέασε τη συχνότητα εμφάνισης NE. Ωστόσο, επηρέασε τη σοβαρότητα των αλλοιώσεων NE, με το ποσοστό των ορνιθίων της ομάδας HP με το μέγιστο βαθμό αλλοιώσεων (6) να εμφανίζεται σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) υψηλότερο, ενώ στην ομάδα P παρατηρήθηκε η αντίθετη εικόνα.

Το ποσοστό των ορνιθίων και ο βαθμός αλλοιώσεων του ήπατος, όπως πρόέκυψε μετά από τη μακροσκοπική του εξέταση, παρουσιάζονται αναλυτικά στον **πίνακα 2.25**.

**Πίνακας 2.25.** Ποσοστό ορνιθίων και βαθμός μακροσκοπικών αλλοιώσεων ήπατος ανά ομάδα κατά τον πειραματισμό της θερμικής καταπόνησης

ΒΑΘΜΟΣ	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ			
	N	HN	P	HP
0,00	52,1%	62,5%	33,3%	31,3%
1,00	29,2%	20,8%	39,6%	43,8%
2,00	18,8%	16,7%	27,1%	25,0%
<b>ΣΥΝΟΛΙΚΑ</b>	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%



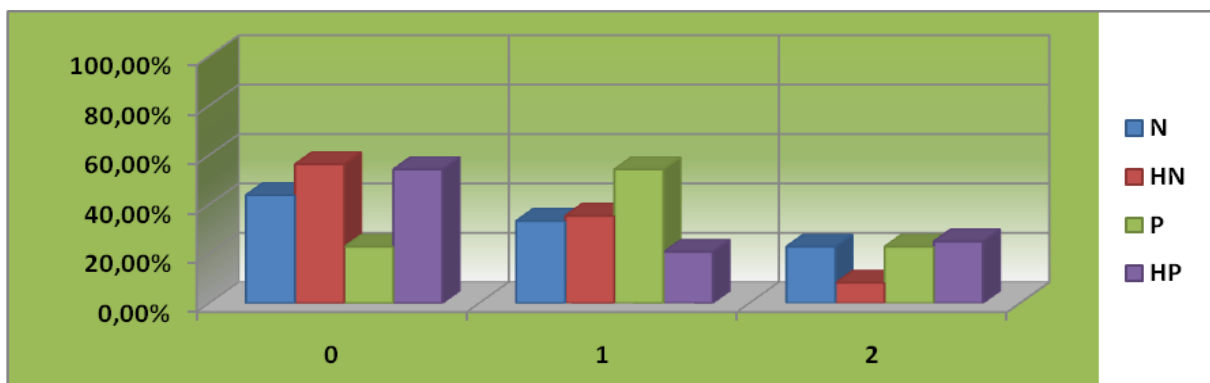
**Διάγραμμα 2.16.** Ποσοστό ορνιθίων και βαθμός μακροσκοπικών αλλοιώσεων ήπατος ανά ομάδα κατά τον πειραματισμό της θερμικής καταπόνησης

Η μικτή μόλυνση των ορνιθίων με *C. perfringens* και *Eimeria* spp. επηρέασε τη συχνότητα εμφάνισης των μακροσκοπικών αλλοιώσεων του ήπατος. Συγκεκριμένα, το ποσοστό των ορνιθίων με φυσιολογικό ήπαρ ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) μικρότερο στις ομάδες P και HP.

Το ποσοστό των ορνιθίων και ο βαθμός αλλοιώσεων του μυώδους στομάχου, όπως πρόέκυψε μετά από τη μακροσκοπική του εξέταση, παρουσιάζονται αναλυτικά στον **πίνακα 2.26**.

**Πίνακας 2.26.** Ποσοστό ορνιθίων και βαθμός μακροσκοπικών αλλοιώσεων μυώδους στομάχου ανά ομάδα κατά τον πειραματισμό της θερμικής καταπόνησης

ΒΑΘΜΟΣ	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ			
	N	HN	P	HP
0,00	43,8%	56,3%	22,9%	54,2%
1,00	33,3%	35,4%	54,2%	20,8%
2,00	22,9%	8,3%	22,9%	25,0%
<b>ΣΥΝΟΛΙΚΑ</b>	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%



**Διάγραμμα 2.17.** Ποσοστό ορνιθίων και βαθμός αλλοιώσεων μυώδους στομάχου ανά ομάδα κατά τον πειραματισμό της θερμικής καταπόνησης

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων του βαθμού μακροσκοπικών αλλοιώσεων του μυώδους στομάχου προκύπτει ότι η μόλυνση των ορνιθίων προκάλεσε αύξηση της συχνότητας εμφάνισης των μακροσκοπικών αλλοιώσεων του μυώδους στομάχου, με το ποσοστό των ορνιθίων με φυσιολογικό μυώδη στόμαχο στην ομάδα P να εμφανίζεται σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) χαμηλότερο. Το ποσοστό των ορνιθίων με το μέγιστο βαθμό αλλοιώσεων (2) ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) χαμηλότερο στην ομάδα HN, υποδηλώνοντας ότι η

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

θερμική καταπόνηση των ορνιθίων υποβάθμισε τη σοβαρότητα των μακροσκοπικών αλλοιώσεων του μυώδους στομάχου.

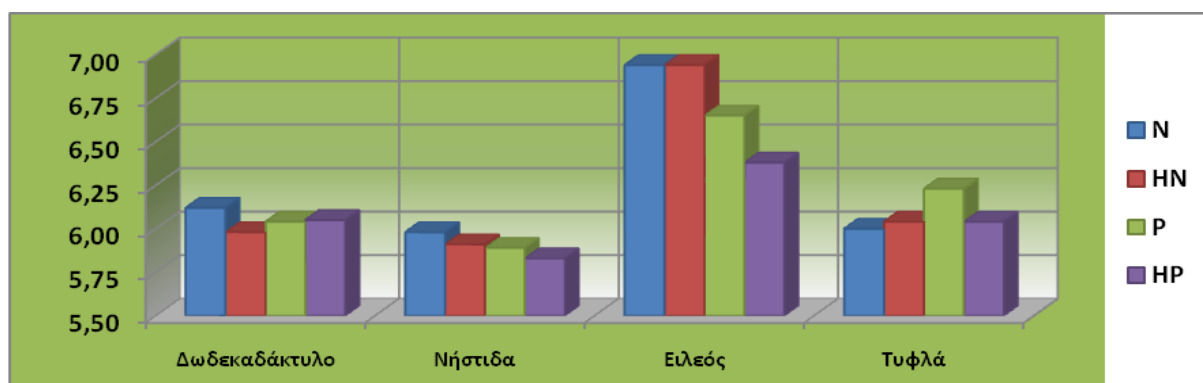
### 2.3.4 Μέτρηση pH εντερικού περιεχομένου

Τα αποτελέσματα της μέτρησης του pH από το περιεχόμενο των τμημάτων του εντέρου παρουσιάζονται στον **πίνακα 2.27**.

**Πίνακας 2.27.** pH του περιεχομένου στο δωδεκαδάκτυλο, τη νήστιδα, τον ειλέο και τα τυφλά ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό της θερμικής καταπόνησης ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ				
	N	HN	P	HP
Δωδεκαδάκτυλο	6,12±0,03 <sup>a</sup>	5,98±0,03 <sup>b</sup>	6,04±0,03 <sup>ab</sup>	6,05±0,03 <sup>ab</sup>
Νήστιδα	5,97±0,02 <sup>a</sup>	5,91±0,03 <sup>ab</sup>	5,89±0,02 <sup>b</sup>	5,83±0,03 <sup>c</sup>
Ειλεός	6,94±0,05 <sup>a</sup>	6,94±0,11 <sup>a</sup>	6,65±0,07 <sup>b</sup>	6,38±0,06 <sup>c</sup>
Τυφλά	6,00±0,06 <sup>a</sup>	6,04±0,06 <sup>ab</sup>	6,23±0,08 <sup>b</sup>	6,04±0,07 <sup>ab</sup>

**Σημείωση:** <sup>a, b, c</sup> Μέσες τιμές στην ίδια γραμμή με διαφορετικό εκθέτη διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ).



**Διάγραμμα 2.18.** Μέση τιμή του pH του περιεχομένου στο δωδεκαδάκτυλο, τη νήστιδα, τον ειλέο και τα τυφλά ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό της θερμικής καταπόνησης

Η τιμή του pH από το περιεχόμενο του δωδεκαδακτύλου διέφερε μόνο μεταξύ των ομάδων N και HN, όπου στην HN το περιεχόμενο ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) πιο όξινο.

Η μόλυνση των ορνιθίων μείωσε σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) την τιμή του pH στη νήστιδα. Μεταξύ των μολυσμένων ομάδων υπήρχε στατιστική διαφορά στην τιμή του pH του περιεχομένου της νήστιδας. Συγκεκριμένα, το περιεχόμενο της νήστιδας της ομάδας HP ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) πιο όξινο από αυτό της ομάδας P.

Η τιμή του pH στο περιεχόμενο του ειλεού στις μολυσμένες ομάδες ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) χαμηλότερη από τις μη μολυσμένες ομάδες. Μεταξύ των μολυσμένων ομάδων

υπήρχε επίσης στατιστική διαφορά στην τιμή του pH του περιεχομένου του ειλεού. Συγκεκριμένα, η ομάδα HP είχε σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) πιο όξινο περιεχόμενο από της ομάδας P.

Η θερμική καταπόνηση δεν είχε σημαντική ( $P > 0.10$ ) επίδραση στην τιμή του pH του περιεχομένου των τυφλών, ενώ αντίθετα η μόλυνση των ορνιθίων προκάλεσε σημαντική ( $P \leq 0.05$ ) αύξηση.

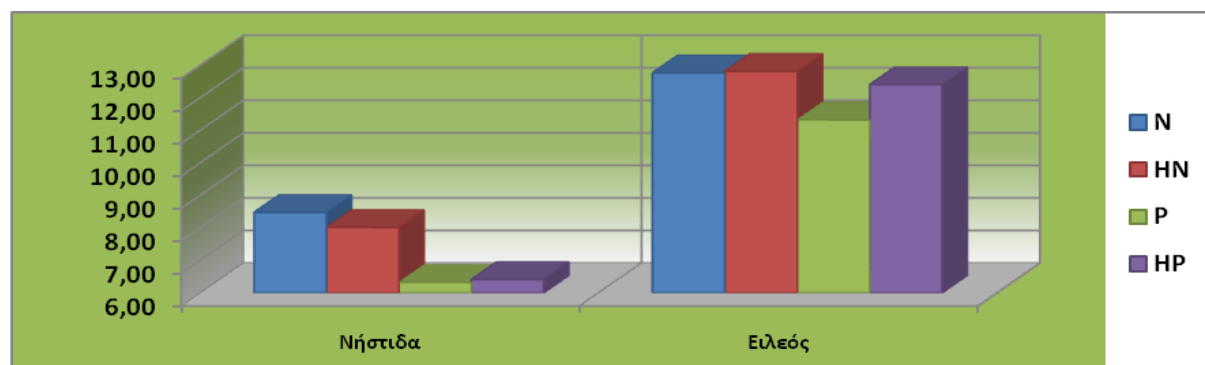
### 2.3.5 Μέτρηση ιξώδους εντερικού περιεχομένου

Τα αποτελέσματα της μέτρησης της τιμής του ιξώδους του περιεχομένου της νήστιδας και του ειλεού παρουσιάζονται στον **πίνακα 2.28**.

**Πίνακας 2.28.** Ιξώδες του περιεχομένου στη νήστιδα και τον ειλέο ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό της θερμικής καταπόνησης ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )

	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ			
	N	HN	P	HP
Νήστιδα	8,48±0,55 <sup>a</sup>	8,02±0,52 <sup>a</sup>	6,33±0,42 <sup>b</sup>	6,42±0,38 <sup>b</sup>
Ειλεός	12,77±0,83 <sup>a</sup>	12,82±0,83 <sup>a</sup>	11,33±1,01 <sup>a</sup>	12,41±0,98 <sup>a</sup>

**Σημείωση:** <sup>a, b</sup> Μέσες τιμές στην ίδια γραμμή με διαφορετικό εκθέτη διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ).



**Διάγραμμα 2.19.** Μέση τιμή του ιξώδους του περιεχομένου στη νήστιδα και τον ειλέο ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό της θερμικής καταπόνησης

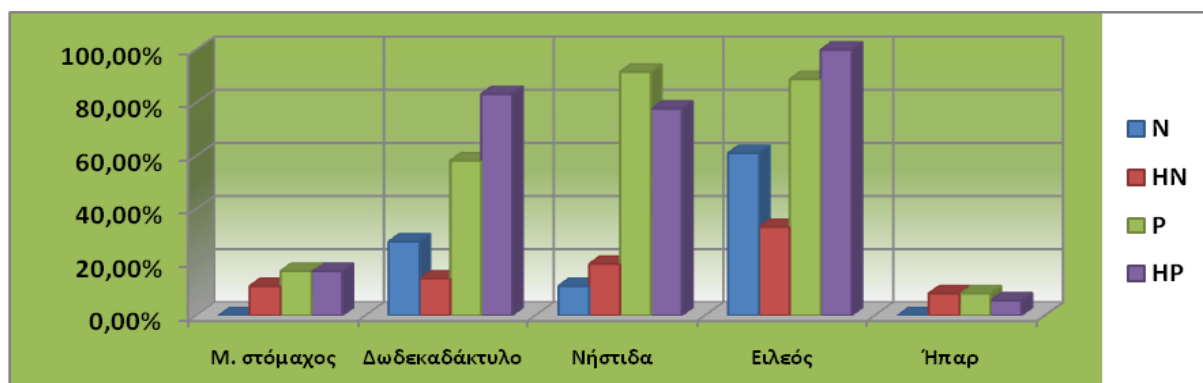
Η στατιστική αξιολόγηση των τιμών του ιξώδους του περιεχομένου του ειλεού δεν έδειξε σημαντική ( $P > 0.10$ ) διαφορά μεταξύ των ομάδων. Ωστόσο, στη νήστιδα, οι ομάδες που μολύνθηκαν, είχαν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) χαμηλότερη τιμή ιξώδους, συγκριτικά με τις ομάδες που δεν μολύνθηκαν.

### 2.3.6 Βακτηριολογική εξέταση

Το ποσοστό των ορνιθίων στα τμήματα από όπου απομονώθηκε το *C. perfringens* παρουσιάζεται αναλυτικά στον **πίνακα 2.29**.

**Πίνακας 2.29.** Ποσοστό απομόνωσης και εντόπιση *C. perfringens* ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό της θερμικής καταπόνησης

ΕΝΤΟΠΙΣΗ	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ			
	N	HN	P	HP
Μυώδης στόμαχος	0,0%	11,1%	16,7%	16,7%
Δωδεκαδάκτυλο	27,8%	13,9%	58,3%	83,3%
Νήστιδα	11,1%	19,4%	91,7%	77,8%
Ειλεός	61,1%	33,3%	88,9%	100,0%
Ήπαρ	0,0%	8,3%	8,3%	5,6%



**Διάγραμμα 2.20.** Ποσοστό απομόνωσης και εντόπιση *C. perfringens* ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό της θερμικής καταπόνησης

Το ποσοστό των ορνιθίων από τα οποία απομονώθηκε το *C. perfringens* ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) μεγαλύτερο στις μολυσμένες ομάδες, P και HP, σε όλα τα τμήματα του εντέρου, υποδηλώνοντας την επιτυχία της μόλυνσης. Αντίθετα, στις ομάδες N και HN, το ποσοστό των ορνιθίων από τα οποία απομονώθηκε το *C. perfringens* ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) χαμηλότερο.

Μεταξύ των μολυσμένων ομάδων δεν υπήρχε διαφορά στη συχνότητα απομόνωσης του *C. perfringens*, με εξαίρεση στο δωδεκαδάκτυλο όπου το ποσοστό απομόνωσης στην ομάδα HP ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) υψηλότερο, συγκριτικά με αυτό στην ομάδα P. Μεταξύ των μη μολυσμένων ομάδων η συχνότητα απομόνωσης του *C. perfringens* από τον ειλέο ήταν μεγαλύτερη στην ομάδα N, συγκριτικά με την HN. Αντίθετα, στο μυώδη στόμαχο και το

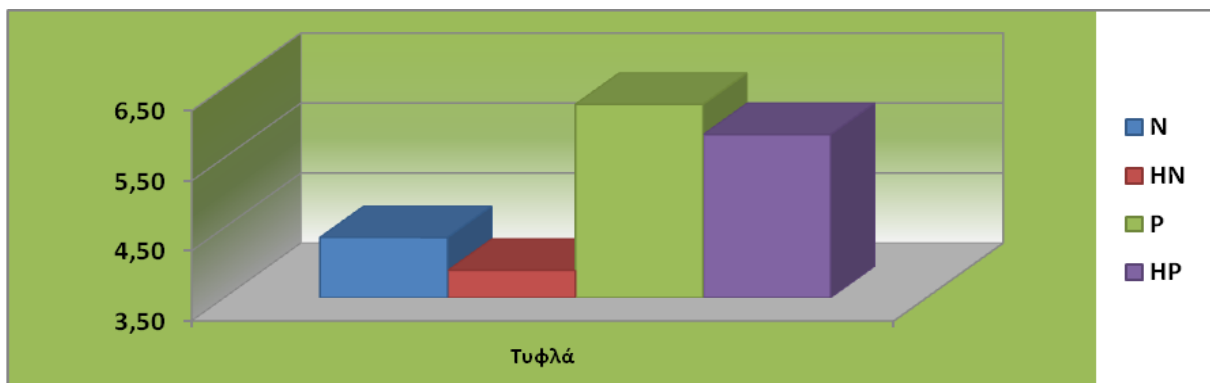
ήπαρ δεν απομονώθηκε *C. perfringens* από κανένα ορνίθιο της ομάδας Ν, ενώ στην ομάδα ΗΝ απομονώθηκε από το 11,1% και 8,3% των ορνιθίων, αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού του *C. perfringens* στα τυφλά παρουσιάζονται στον **πίνακα 2.30.**, εκφρασμένα σε cfu/g τυφλών μετά τη μετατροπή τους σε δεκαδικό λογάριθμο.

**Πίνακας 2.30.** Πληθυσμός ( $\log_{10}$ ) του *C. perfringens* εκφρασμένος σε cfu/g τυφλών ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό της θερμικής καταπόνησης ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ				
	N	HN	P	HP
$\text{Log}_{10} C. perfringens$	4,36±0,17 <sup>a</sup>	3,89±0,44 <sup>a</sup>	6,26±0,19 <sup>b</sup>	5,83±0,23 <sup>b</sup>

**Σημείωση:** <sup>a, b</sup> Μέσες τιμές με διαφορετικό εκθέτη διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ).



**Διάγραμμα 2.21.** Μέσος πληθυσμός ( $\log_{10}$ ) του *C. perfringens* εκφρασμένος σε cfu/g τυφλών ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό της θερμικής καταπόνησης

Οι μολυσμένες ομάδες είχαν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) υψηλότερο πληθυσμό *C. perfringens* στα τυφλά, συγκριτικά με τις μη μολυσμένες ομάδες, υποδηλώνοντας την επιτυχία της μόλυνσης. Η θερμική καταπόνηση δεν είχε σημαντική ( $P > 0.10$ ) επίδραση στον πληθυσμό του *C. perfringens* στα τυφλά.

**2.4 Πειραματισμός καταπόνησης λόγω ψύχους****2.4.1 Σωματικό βάρος και δείκτης μετατρεψιμότητας της τροφής**

Στον **πίνακα 2.31**, παρουσιάζεται το ΣΒ ανά ορνίθιο όλων των ομάδων πριν και μετά τη μόλυνση και την καταπόνηση λόγω ψύχους. Οι τιμές του ΔΜΤ, πριν και μετά την εφαρμογή των πειραματικών χειρισμών, παρουσιάζονται στον **πίνακα 2.32**.

**Πίνακας 2.31.** ΣΒ (g) ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό της καταπόνησης λόγω ψύχους ανάλογα με την ηλικία

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ				
ΗΛΙΚΙΑ	N	CN	P	CP
1 <sup>η</sup> ημέρα	45	45	45	45
10 <sup>η</sup> ημέρα	120	120	120	135
16 <sup>η</sup> ημέρα	340	330	340	345
17 <sup>η</sup> ημέρα	380	380	365	385
21 <sup>η</sup> ημέρα	650	630	605	620

**Πίνακας 2.32.** ΔΜΤ ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό της καταπόνησης λόγω ψύχους

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ				
ΔΙΑΣΤΗΜΑ	N	CN	P	CP
10 <sup>η</sup> -16 <sup>η</sup> ημέρα	2,76	2,80	3,40	2,50
17 <sup>η</sup> -21 <sup>η</sup> ημέρα	2,25	2,05	2,33	2,30

Το ΣΒ ανά ορνίθιο όλων των ομάδων δεν διέφερε σε καμία από τις ζυγίσεις που διεξήχθησαν έως την ηλικία των 17 ημερών. Αντίθετα, στη ζύγιση που διεξήχθη στην ηλικία των 21 ημερών, το ΣΒ ανά ορνίθιο διέφερε, υποδηλώνοντας ότι τόσο η μόλυνση όσο και η καταπόνηση λόγω ψύχους είχαν άμεση επίδραση. Συγκεκριμένα, το ΣΒ ανά ορνίθιο των ομάδων που μολύνθηκαν ήταν μικρότερο από αυτό των ομάδων που δεν μολύνθηκαν. Επίσης, το ΣΒ ανά ορνίθιο της ομάδας CN ήταν μικρότερο από αυτό της ομάδας N.

Ο ΔΜΤ, ιδιαίτερα πριν τους πειραματικούς χειρισμούς, ήταν πολύ υψηλός σε όλες τις ομάδες. Η μετάβαση από το σιτηρέσιο Β στο σιτηρέσιο Γ τη 17<sup>η</sup> ημέρα βελτίωσε το ΔΜΤ. Από τη συγκριτική μελέτη των αποτελεσμάτων του ΔΜΤ, προκύπτει ότι η καταπόνηση των ορνιθίων λόγω ψύχους και η μόλυνση των ορνιθίων δεν είχαν άμεση επίδραση στο ΔΜΤ.

#### **2.4.2 Παρασιτολογική εξέταση**

Τα αποτελέσματα της παρασιτολογικής εξέτασης των κοπράνων που διενεργήθηκε την 9<sup>η</sup>, τη 16<sup>η</sup> και την 20<sup>η</sup> ημέρα της ζωής των ορνιθίων στις ομάδες N και CN ήταν αρνητικά, υποδηλώνοντας την απουσία επιμόλυνσης των πειραματικών ομάδων με *Eimeria* spp. Στις ομάδες P και CP, τα αποτελέσματα της εξέτασης ήταν αρνητικά την 9<sup>η</sup> και τη 16<sup>η</sup> ημέρα της ζωής των ορνιθίων και θετικά την 20<sup>η</sup> ημέρα, επιβεβαιώνοντας την επιτυχή μόλυνση με *Eimeria* spp. που διεξήχθη τη 18<sup>η</sup> ημέρα. Επίσης, τα αποτελέσματα της μικροσκοπικής εξέτασης των επιχρισμάτων από τον εντερικό βλεννογόνο και το περιεχόμενο ήταν αρνητικά για τις ομάδες N και CN και θετικά για τις ομάδες P και CP.

#### **2.4.3 Μακροσκοπική εξέταση**

Το ποσοστό των ορνιθίων που εκδήλωσαν αλλοιώσεις NE και ο μ.ο. του βαθμού αλλοιώσεων, όπως πρόέκυψε μετά από τη μακροσκοπική εξέταση του εντέρου, παρουσιάζονται αναλυτικά στον **πίνακα 2.33.** και **2.34.**



## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

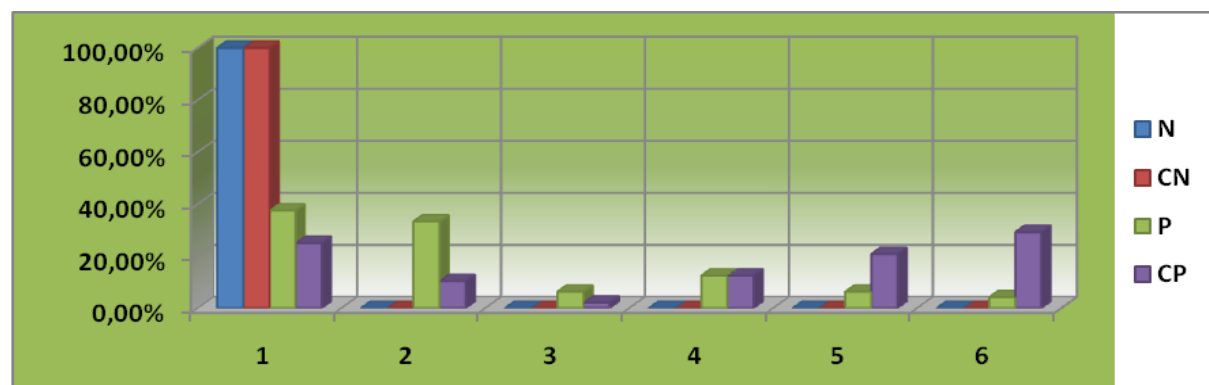
**Πίνακας 2.33.** Ποσοστό ορνιθίων και βαθμός αλλοιώσεων NE ανά ομάδα κατά τον πειραματισμό της καταπόνησης λόγω ψύχους

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ				
ΒΑΘΜΟΣ	N	CN	P	CP
1,00	100,0%	100,0%	37,4%	25,0%
2,00	0,0%	0,0%	33,3%	10,4%
3,00	0,0%	0,0%	6,3%	2,1%
4,00	0,0%	0,0%	12,5%	12,5%
5,00	0,0%	0,0%	6,3%	20,8%
6,00	0,0%	0,0%	4,2%	29,2%
<b>ΣΥΝΟΛΙΚΑ</b>	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

**Πίνακας 2.34.** Μέσος όρος βαθμού αλλοιώσεων NE ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό της καταπόνησης λόγω ψύχους ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ				
	N	CN	P	CP
<b>Μ.Ο</b>	1,00±0,00 <sup>a</sup>	1,00±0,00 <sup>a</sup>	2,29±0,21 <sup>b</sup>	3,81±0,29 <sup>c</sup>

Σημείωση: <sup>a, b, c</sup> Μέσες τιμές με διαφορετικό εκθέτη διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ).



**Διάγραμμα 2.22.** Ποσοστό ορνιθίων και βαθμός αλλοιώσεων NE ανά ομάδα κατά τον πειραματισμό της καταπόνησης λόγω ψύχους

Ο μ.ο. του βαθμού αλλοιώσεων NE στο έντερο όλων των ορνιθίων των ομάδων N και CN, σε όλες τις δειγματοληψίες και τις μακροσκοπικές εξετάσεις που ακολούθησαν, ήταν 1, που σημαίνει ότι κανένα ορνίθιο δεν εμφάνισε αλλοιώσεις NE. Αυτό είναι φυσιολογικό και αναμενόμενο γιατί τα ορνίθια αυτά δεν μολύνθηκαν. Αντίθετα, ο μ.ο. του βαθμού αλλοιώσεων NE των ομάδων P και CP ήταν μεγαλύτερος από 1, υποδηλώνοντας ότι στα ορνίθια των παραπάνω ομάδων εκδηλώθηκαν αλλοιώσεις NE στον εντερικό βλεννογόνο.

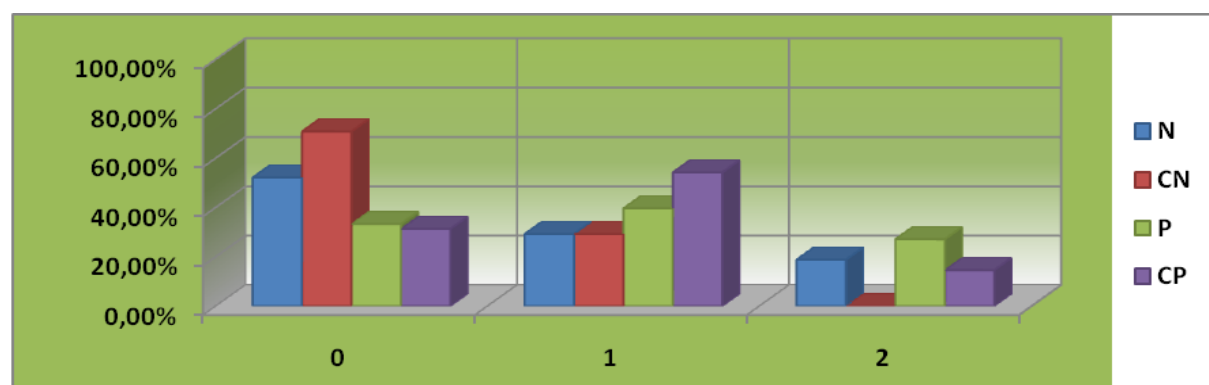
Μεταξύ των πειραματικών ομάδων υπήρχε στατιστική διαφορά. Συγκεκριμένα, ο μ.ο. του βαθμού αλλοιώσεων NE των μη μολυσμένων ομάδων ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) μικρότερος από το μ.ο. των μολυσμένων ομάδων. Επίσης, μεταξύ των μολυσμένων ομάδων, ο μ.ο. της ομάδας CP ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) υψηλότερος από αυτόν της ομάδας P.

Πιο αναλυτικά, όπως φαίνεται και από τα στοιχεία του **πίνακα 2.33.**, η καταπόνηση των ορνιθίων λόγω ψύχους προκάλεσε σημαντική ( $P \leq 0.05$ ) αύξηση της σοβαρότητας των αλλοιώσεων NE. Συγκεκριμένα, στην ομάδα CP το ποσοστό των ορνιθίων που εμφάνισαν αλλοιώσεις NE βαθμού 2 (ήπιες αλλοιώσεις) ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) χαμηλότερο και το ποσοστό των ορνιθίων που εμφάνισαν αλλοιώσεις NE βαθμού 5 και 6 ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) υψηλότερο, ενώ στην ομάδα P ήταν η αντίθετη εικόνα. Επίσης, η καταπόνηση των ορνιθίων λόγω ψύχους προκάλεσε αύξηση της συχνότητας εμφάνισης της NE, χωρίς όμως το ποσοστό των ορνιθίων που εμφάνισαν αλλοιώσεις να διαφέρει σημαντικά ( $P > 0.10$ ).

Το ποσοστό των ορνιθίων και ο βαθμός αλλοιώσεων του ήπατος, όπως πρόέκυψε μετά από τη μακροσκοπική του εξέταση, παρουσιάζονται αναλυτικά στον **πίνακα 2.35.**

**Πίνακας 2.35.** Ποσοστό ορνιθίων και βαθμός μακροσκοπικών αλλοιώσεων ήπατος ανά ομάδα κατά τον πειραματισμό της καταπόνησης λόγω ψύχους

ΒΑΘΜΟΣ	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ			
	N	CN	P	CP
0,00	52,1%	70,8%	33,3%	31,3%
1,00	29,2%	29,2%	39,6%	54,2%
2,00	18,8%	0,0%	27,1%	14,6%
<b>ΣΥΝΟΛΙΚΑ</b>	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%



**Διάγραμμα 2.23.** Ποσοστό ορνιθίων και βαθμός μακροσκοπικών αλλοιώσεων ήπατος ανά ομάδα κατά τον πειραματισμό της καταπόνησης λόγω ψύχους

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

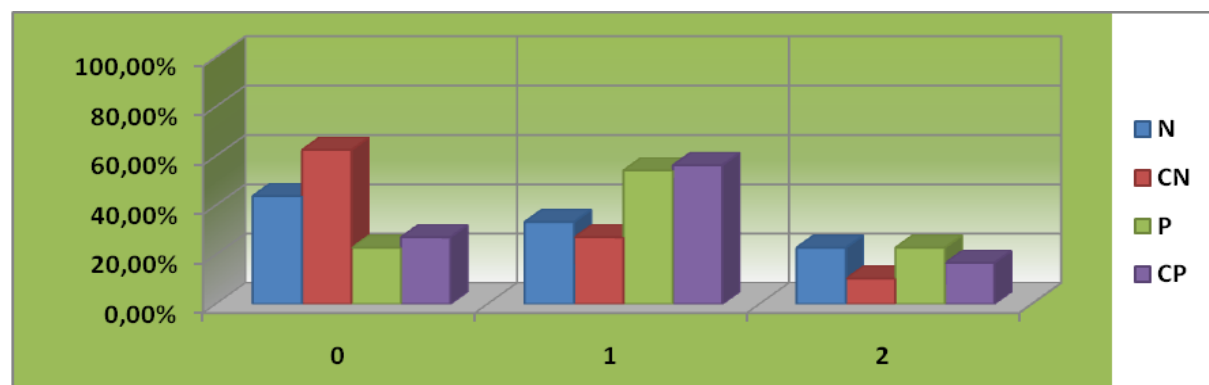
Από τη μελέτη των αποτελεσμάτων του **πίνακα 2.35**, προκύπτει ότι η μόλυνση είχε άμεση επίδραση στη συχνότητα εμφάνισης και τη σοβαρότητα των μακροσκοπικών αλλοιώσεων του ήπατος. Συγκεκριμένα, στην ομάδα P το ποσοστό των ορνιθίων χωρίς μακροσκοπικές αλλοιώσεις στο ήπαρ ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) μικρότερο και το ποσοστό των ορνιθίων με μακροσκοπικές αλλοιώσεις μέγιστου βαθμού ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) υψηλότερο.

Η καταπόνηση των ορνιθίων λόγω ψύχους φαίνεται να περιορίσει τη σοβαρότητα και τη συχνότητα εμφάνισης των μακροσκοπικών αλλοιώσεων του ήπατος. Στην ομάδα CN το ποσοστό των ορνιθίων με φυσιολογικό ήπαρ ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) μεγαλύτερο, ενώ το ποσοστό των ορνιθίων που εμφάνισαν αλλοιώσεις μέγιστου βαθμού ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) μικρότερο, ενώ στις υπόλοιπες ομάδες παρατηρήθηκε η αντίθετη εικόνα.

Το ποσοστό των ορνιθίων και ο βαθμός αλλοιώσεων του μυώδους στομάχου, όπως πρόεκυψε μετά από τη μακροσκοπική του εξέταση, παρουσιάζονται αναλυτικά στον **πίνακα 2.36**.

**Πίνακας 2.36.** Ποσοστό ορνιθίων και βαθμός μακροσκοπικών αλλοιώσεων μυώδους στομάχου ανά ομάδα κατά τον πειραματισμό της καταπόνησης λόγω ψύχους

ΒΑΘΜΟΣ	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ			
	N	CN	P	CP
0,00	43,8%	62,5%	22,9%	27,1%
1,00	33,3%	27,1%	54,2%	56,3%
2,00	22,9%	10,4%	22,9%	16,7%
<b>ΣΥΝΟΛΙΚΑ</b>	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%



**Διάγραμμα 2.24.** Ποσοστό ορνιθίων και βαθμός αλλοιώσεων μυώδους στομάχου ανά ομάδα κατά τον πειραματισμό της καταπόνησης λόγω ψύχους

Από τη μελέτη των αποτελεσμάτων του **πίνακα 2.36**, προκύπτει ότι η μόλυνση είχε άμεση επίδραση στη συχνότητα εμφάνισης μακροσκοπικών αλλοιώσεων στο μυώδη στομάχο. Συγκεκριμένα, το ποσοστό των ορνιθίων με φυσιολογικό μυώδη στομάχο στις ομάδες P και CP ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) χαμηλότερο.

Η καταπόνηση των ορνιθίων λόγω ψύχους περιόρισε τόσο τη συχνότητα εμφάνισης όσο και τη σοβαρότητα των μακροσκοπικών αλλοιώσεων του μυώδους στομάχου. Συγκεκριμένα, στην ομάδα CN το ποσοστό των ορνιθίων με φυσιολογικό μυώδη στομάχο ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) υψηλότερο, ενώ το ποσοστό των ορνιθίων με το μέγιστο βαθμό αλλοιώσεων ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) χαμηλότερο.

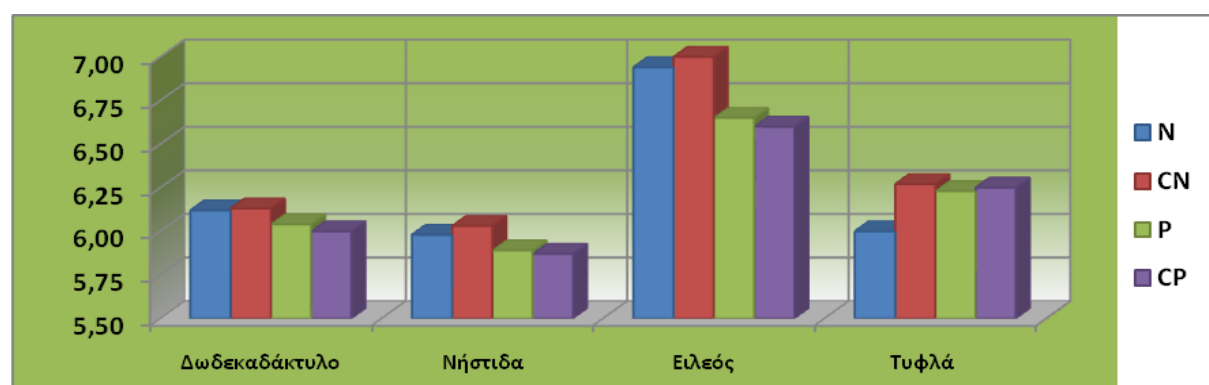
#### 2.4.4 Μέτρηση pH εντερικού περιεχομένου

Τα αποτελέσματα της μέτρησης του pH του περιεχομένου των τμημάτων του εντέρου παρουσιάζονται στον **πίνακα 2.37**.

**Πίνακας 2.37.** pH του περιεχομένου στο δωδεκαδάκτυλο, τη νήστιδα, τον ειλέο και τα τυφλά ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό της καταπόνησης λόγω ψύχους ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )

	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ			
	N	CN	P	CP
Δωδεκαδάκτυλο	6,12±0,03 <sup>ab</sup>	6,13±0,02 <sup>a</sup>	6,04±0,03 <sup>bc</sup>	6,00±0,03 <sup>c</sup>
Νήστιδα	5,97±0,02 <sup>a</sup>	6,03±0,03 <sup>a</sup>	5,89±0,02 <sup>b</sup>	5,87±0,03 <sup>b</sup>
Ειλεός	6,94±0,05 <sup>a</sup>	7,03±0,05 <sup>a</sup>	6,65±0,07 <sup>b</sup>	6,60±0,07 <sup>b</sup>
Τυφλά	6,00±0,06 <sup>a</sup>	6,27±0,07 <sup>b</sup>	6,23±0,08 <sup>b</sup>	6,25±0,07 <sup>b</sup>

**Σημείωση:** <sup>a, b, c</sup> Μέσες τιμές στην ίδια γραμμή με διαφορετικό εκθέτη διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ).



**Διάγραμμα 2.25.** Μέση τιμή του pH του περιεχομένου στο δωδεκαδάκτυλο, τη νήστιδα, τον ειλέο και τα τυφλά ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό της καταπόνησης λόγω ψύχους

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η μόλυνση των ορνιθίων είχε σημαντική ( $P \leq 0.05$ ) επίδραση στη διαμόρφωση του pH του εντερικού περιεχομένου. Συγκεκριμένα, το pH του περιεχομένου της νήστιδας και του ειλεού των ομάδων P και CP ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) χαμηλότερο από αυτό των ομάδων N και CN. Επίσης, το pH του περιεχομένου των τυφλών της ομάδας P ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) υψηλότερο από της ομάδας N.

Η καταπόνηση των ορνιθίων λόγω ψύχους επηρέασε την τιμή του pH του περιεχομένου των τυφλών, προκαλώντας σημαντική ( $P \leq 0.05$ ) αύξηση, όπως προκύπτει από τη συγκριτική μελέτη των αποτελεσμάτων των ομάδων N και CN.

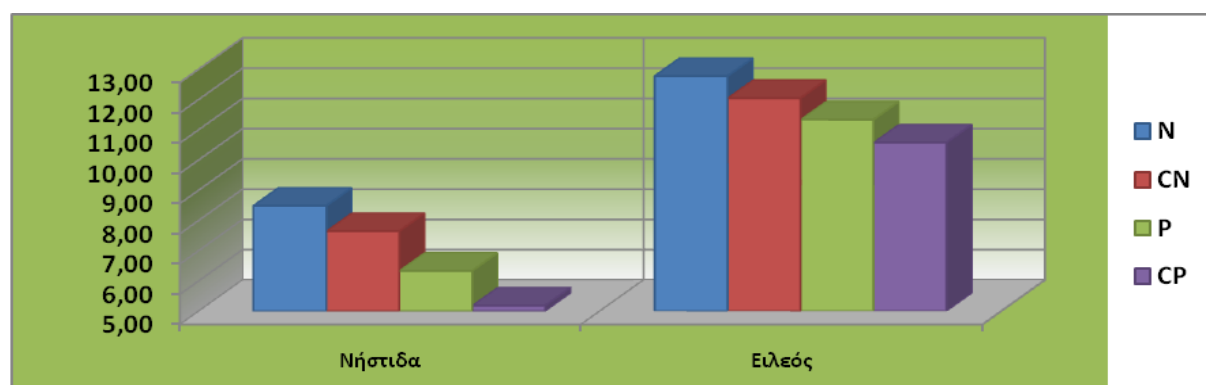
### 2.4.5 Μέτρηση ιξώδους εντερικού περιεχομένου

Τα αποτελέσματα της μέτρησης του ιξώδους του περιεχομένου της νήστιδας και του ειλεού παρουσιάζονται στον **πίνακα 2.38**.

**Πίνακας 2.38.** Ιξώδες του περιεχομένου στη νήστιδα και τον ειλέο ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό της καταπόνησης λόγω ψύχους ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ				
	N	CN	P	CP
Νήστιδα	8,48±0,55 <sup>a</sup>	7,64±0,45 <sup>b</sup>	6,33±0,42 <sup>b</sup>	5,18±0,45 <sup>c</sup>
Ειλεός	12,77±0,83 <sup>a</sup>	12,04±0,68 <sup>a</sup>	11,33±1,01 <sup>a</sup>	10,57±0,86 <sup>a</sup>

**Σημείωση:** <sup>a, b, c</sup> Μέσες τιμές στην ίδια γραμμή με διαφορετικό εκθέτη διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ).



**Διάγραμμα 2.26.** Μέση τιμή του ιξώδους του περιεχομένου στη νήστιδα και τον ειλέο ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό της καταπόνησης λόγω ψύχους

Από τη στατιστική ανάλυση και τη συγκριτική μελέτη των αποτελεσμάτων του ιξώδους της νήστιδας προκύπτει ότι η μόλυνση και η καταπόνηση λόγω ψύχους είχαν αρνητική επίδραση στη διαμόρφωση της τιμής του ιξώδους. Συγκεκριμένα, οι μολυσμένες ομάδες είχαν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) χαμηλότερη τιμή ιξώδους, συγκριτικά με την ομάδα N.

Επίσης, η τιμή του ιξώδους ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) χαμηλότερη στην ομάδα CN, συγκριτικά με την ομάδα N και στην ομάδα CP, συγκριτικά με την ομάδα P.

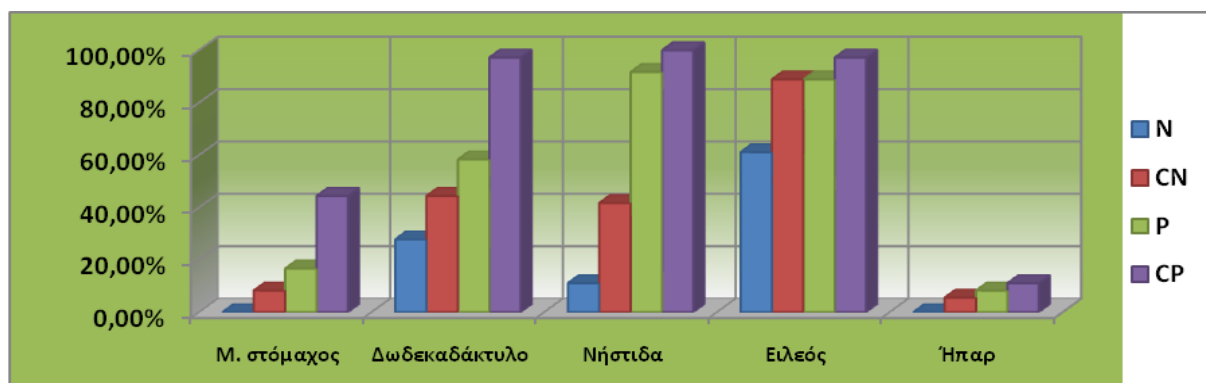
Η στατιστική αξιολόγηση των τιμών του ιξώδους του περιεχομένου του ειλεού δεν έδειξε σημαντική ( $P > 0.10$ ) διαφορά μεταξύ των ομάδων. Ωστόσο, όπως και στη νήστιδα, φαίνεται ότι η μόλυνση και ο συνδυασμός της με την καταπόνηση λόγω ψύχους είχαν αρνητική επίδραση στη διαμόρφωση της τιμής του ιξώδους.

#### 2.4.6 Βακτηριολογική εξέταση

Το ποσοστό των ορνιθίων στα τμήματα από τα οποία απομονώθηκε το *C. perfringens* παρουσιάζεται αναλυτικά στον **πίνακα 2.39**.

**Πίνακας 2.39.** Ποσοστό απομόνωσης και εντόπιση *C. perfringens* ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό της καταπόνησης λόγω ψύχους

ΕΝΤΟΠΙΣΗ	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ			
	N	CN	P	CP
Μυώδης στόμαχος	0,0%	8,3%	16,7%	44,4%
Δωδεκαδάκτυλο	27,8%	44,4%	58,3%	97,2%
Νήστιδα	11,1%	41,7%	91,7%	100,0%
Ειλεός	61,1%	88,9%	88,9%	97,2%
Ήπαρ	0,0%	5,6%	8,3%	11,1%



**Διάγραμμα 2.27.** Ποσοστό απομόνωσης και εντόπιση *C. perfringens* ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό της καταπόνησης λόγω ψύχους

Σε όλα τα τμήματα του γαστρεντερικού σωλήνα, το ποσοστό των ορνιθίων από τα οποία απομονώθηκε το *C. perfringens* ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) μικρότερο στην ομάδα N, υποδηλώνοντας την άμεση επίδραση της μόλυνσης. Η καταπόνηση των ορνιθίων λόγω ψύχους επηρέασε το ποσοστό των ορνιθίων από τα οποία απομονώθηκε το *C. perfringens*

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

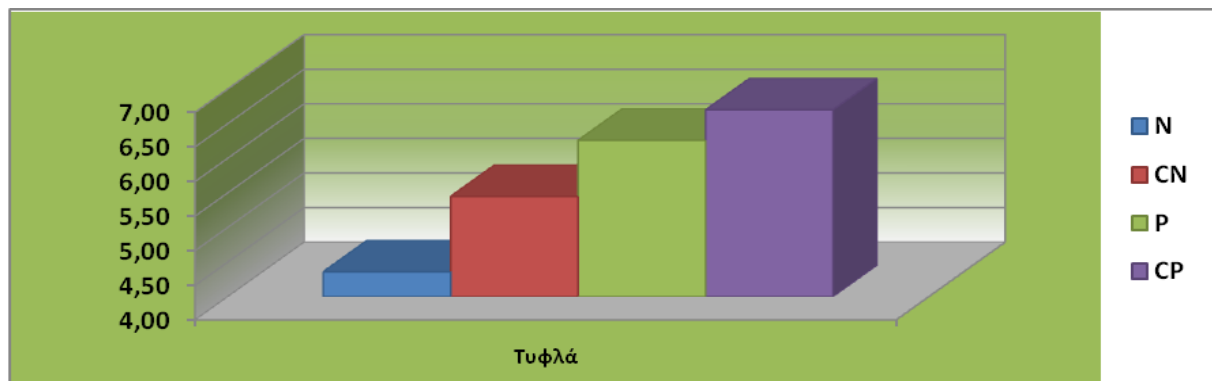
από το έντερο, προκαλώντας την αύξησή του, όπως φαίνεται από τη σύγκριση των ομάδων CN και N.

Τα αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού του *C. perfringens* στα τυφλά παρουσιάζονται στον **πίνακα 2.40.**, εκφρασμένα σε cfu/g τυφλών μετά τη μετατροπή τους σε δεκαδικό λογάριθμο.

**Πίνακας 2.40.** Πληθυσμός ( $\log_{10}$ ) του *C. perfringens* εκφρασμένος σε cfu/g τυφλών ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό της καταπόνησης λόγω ψύχους ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ				
	N	CN	P	CP
$\text{Log}_{10} C. perfringens$	4,36 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>	5,45 $\pm$ 0,20 <sup>b</sup>	6,26 $\pm$ 0,19 <sup>c</sup>	6,70 $\pm$ 0,18 <sup>c</sup>

**Σημείωση:** <sup>a, b, c</sup> Μέσες τιμές με διαφορετικό εκθέτη διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ).



**Διάγραμμα 2.28.** Μέσος πληθυσμός ( $\log_{10}$ ) του *C. perfringens* εκφρασμένος σε cfu/g τυφλών ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό της καταπόνησης λόγω ψύχους

Από τη συγκριτική μελέτη των αποτελεσμάτων, προκύπτει ότι η μόλυνση είχε σημαντική ( $P \leq 0.05$ ) επίδραση στον πληθυσμό του *C. perfringens* στα τυφλά. Συγκεκριμένα, ο πληθυσμός του *C. perfringens* στα τυφλά ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) υψηλότερος στις μολυσμένες ομάδες, συγκριτικά με τις μη μολυσμένες ομάδες. Επίσης, η καταπόνηση των ορνιθίων λόγω ψύχους επηρέασε τον πληθυσμό του *C. perfringens* στα τυφλά, προκαλώντας σημαντική ( $P \leq 0.05$ ) αύξηση, όπως φαίνεται από τη σύγκριση των ομάδων CN και N.

**2.5 Πειραματισμός εμβολιασμού με ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο****2.5.1 Σωματικό βάρος και δείκτης μετατρεψιμότητας της τροφής**

Στους πίνακες 2.41. και 2.42. παρουσιάζονται το ΣΒ ανά ορνίθιο όλων των ομάδων και οι τιμές του ΔΜΤ, αντίστοιχα.

**Πίνακας 2.41.** ΣΒ (g) ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό του εμβολιασμού με ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο ανάλογα με την ηλικία

ΗΛΙΚΙΑ	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ				
	N	PN	P	M	PM
1 <sup>η</sup> ημέρα	45	45	45	45	45
10 <sup>η</sup> ημέρα	120	120	120	115	115
16 <sup>η</sup> ημέρα	340	310	340	325	300
17 <sup>η</sup> ημέρα	380	340	365	345	325
21 <sup>η</sup> ημέρα	650	595	605	575	565

**Πίνακας 2.42.** ΔΜΤ ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό του εμβολιασμού με ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο

ΔΙΑΣΤΗΜΑ	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ				
	N	PN	P	M	PM
10 <sup>η</sup> -16 <sup>η</sup> ημέρα	2,76	3,00	3,40	2,60	2,60
17 <sup>η</sup> -21 <sup>η</sup> ημέρα	2,25	2,65	2,33	3,05	2,70

Το ΣΒ ανά ορνίθιο όλων των ομάδων δεν διέφερε έως την ηλικία των 10 ημερών. Η εφαρμογή του αντικοκκιδιακού εμβολιασμού δεν επηρέασε το ΣΒ, λόγω του μικρού χρονικού διαστήματος που μεσολάβησε από την εφαρμογή του έως τη ζύγιση των ορνιθίων.

Από τα αποτελέσματα της ζύγισης τη 16<sup>η</sup> και τη 17<sup>η</sup> ημέρα της ζωής των ορνιθίων, δηλαδή στο χρονικό διάστημα πριν τη μόλυνση, προκύπτει ότι το ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο προκάλεσε καθυστέρηση στην ανάπτυξη, με το ΣΒ ανά ορνίθιο των ομάδων PN και PM, οι οποίες εμβολιάστηκαν, να εμφανίζεται μικρότερο από το ΣΒ ανά ορνίθιο των ομάδων N και P που δεν εμβολιάστηκαν.

Την 21<sup>η</sup> ημέρα, το ΣΒ ανά ορνίθιο όλων των ομάδων διέφερε μεταξύ τους. Τα ορνίθια της ομάδας N, τα οποία δεν εμβολιάστηκαν και δεν μολύνθηκαν, είχαν υψηλότερο ΣΒ, συγκριτικά με τα ορνίθια της ομάδας PN, τα οποία εμβολιάστηκαν και δεν μολύνθηκαν. Τα



ορνίθια της ομάδας M, τα οποία μολύνθηκαν με *C. perfringens* και *E. maxima* και της ομάδας PM, τα οποία εμβολιάστηκαν και μολύνθηκαν με *C. perfringens* και *E. maxima*, είχαν μικρότερο ΣΒ από τα ορνίθια της ομάδας P, τα οποία μολύνθηκαν με *C. perfringens* και δεκαπλάσια δόση ΕΛΔ αντικοκκιδιακού εμβολίου. Από τα παραπάνω προκύπτει ότι τόσο η εφαρμογή του εμβολιασμού όσο και η μικτή μόλυνση με *C. perfringens* και *E. maxima* είχαν αρνητική επίδραση στο ΣΒ, με αποτέλεσμα την καθυστέρηση στην ανάπτυξη των ορνιθίων.

Ο ΔΜΤ ήταν πολύ υψηλός σε όλες τις ομάδες, ιδιαίτερα κατά το διάστημα 10<sup>η</sup>-16<sup>η</sup> ημέρα της ζωής των πτηνών, με αποτέλεσμα να μην μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για την επίδραση του ΕΛΔ αντικοκκιδιακού εμβολίου. Η μετάβαση από το σιτηρέσιο Β στο σιτηρέσιο Γ, το οποίο περιείχε ιχθυάλευρο αντί σόγιας, βελτίωσε το ΔΜΤ με εξαίρεση τις ομάδες M και PM. Η ομάδα N είχε μικρότερο ΔΜΤ, συγκριτικά με την ομάδα PN, η οποία εμβολιάστηκε, υποδηλώνοντας ότι ο εμβολιασμός προκάλεσε αύξηση του ΔΜΤ.

Κατά το διάστημα 17<sup>η</sup>-21<sup>η</sup> ημέρα της ζωής των πτηνών, η ομάδα M είχε υψηλότερο ΔΜΤ από την ομάδα P, υποδηλώνοντας ότι η μικτή μόλυνση των ορνιθίων με *C. perfringens* και *E. maxima* οδήγησε σε αύξηση του ΔΜΤ, συγκριτικά με τη μόλυνση με *C. perfringens* και δεκαπλάσια δόση ΕΛΔ αντικοκκιδιακού εμβολίου. Η ομάδα PM είχε μικρότερο ΔΜΤ από την ομάδα M, υποδηλώνοντας ότι η εφαρμογή του αντικοκκιδιακού εμβολίου την 1<sup>η</sup> ημέρα της ζωής των ορνιθίων περιόρισε την αρνητική επίδραση της μικτής μόλυνσης των ορνιθίων με *C. perfringens* και *E. maxima*.

### **2.5.2 Παρασιτολογική εξέταση**

Τα αποτελέσματα της παρασιτολογικής εξέτασης των κοπράνων που διενεργήθηκε την 9<sup>η</sup> και τη 16<sup>η</sup> ημέρα της ζωής των ορνιθίων στις ομάδες N, P και M ήταν αρνητικά, υποδηλώνοντας την απουσία επιμόλυνσης με *Eimeria* spp. Στις ομάδες P και M τα αποτελέσματα της παρασιτολογικής την 20<sup>η</sup> ημέρα της ζωής των ορνιθίων ήταν θετικά, υποδηλώνοντας την επιτυχία της μόλυνσης με δεκαπλάσια δόση ΕΛΔ αντικοκκιδιακού εμβολίου και *E. maxima*, αντίστοιχα. Στις ομάδες PN και PM, τα αποτελέσματα της εξέτασης ήταν θετικά την 9<sup>η</sup>, 16<sup>η</sup> και την 20<sup>η</sup> ημέρα της ζωής των ορνιθίων, επιβεβαιώνοντας την επιτυχία του εμβολιασμού με το ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο, που διεξήχθη την 1<sup>η</sup> ημέρα της ζωής των ορνιθίων. Επίσης, τα αποτελέσματα της μικροσκοπικής εξέτασης των επιχρισμάτων από τον εντερικό βλεννογόνο και το περιεχόμενο ήταν αρνητικά για την ομάδα N και θετικά για τις υπόλοιπες ομάδες.

### 2.5.3 Μακροσκοπική εξέταση

Το ποσοστό των ορνιθίων που εκδήλωσαν αλλοιώσεις ΝΕ και ο μ.ο. του βαθμού αλλοιώσεων, όπως πρόέκυψε μετά από τη μακροσκοπική εξέταση του εντέρου, παρουσιάζονται αναλυτικά στους πίνακες 2.43. και 2.44.

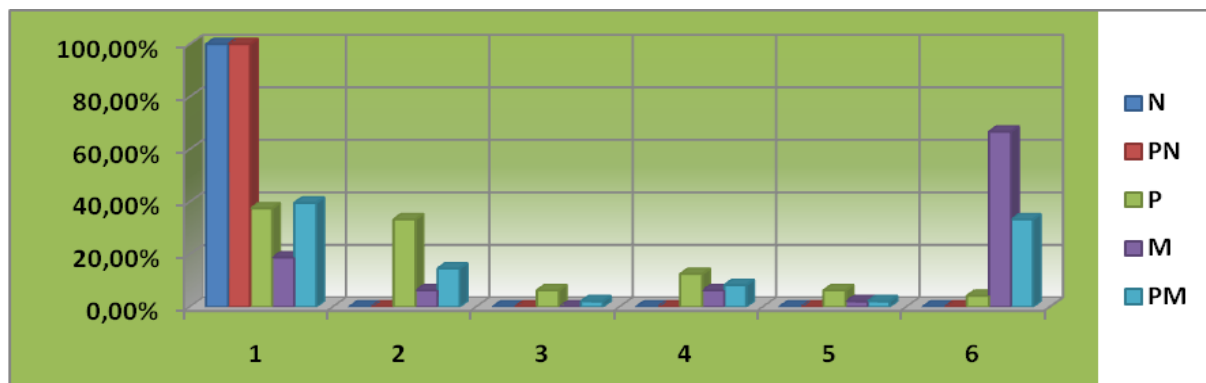
**Πίνακας 2.43.** Ποσοστό ορνιθίων και βαθμός αλλοιώσεων ΝΕ ανά ομάδα κατά τον πειραματισμό του εμβολιασμού με ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ					
ΒΑΘΜΟΣ	N	PN	P	M	PM
1,00	100,0%	100,0%	37,4%	18,8%	39,6%
2,00	0,0%	0,0%	33,3%	6,3%	14,6%
3,00	0,0%	0,0%	6,3%	0,0%	2,1%
4,00	0,0%	0,0%	12,5%	6,3%	8,3%
5,00	0,0%	0,0%	6,3%	2,1%	2,1%
6,00	0,0%	0,0%	4,2%	66,7%	33,3%
<b>ΣΥΝΟΛΙΚΑ</b>	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

**Πίνακας 2.44.** Μέσος όρος βαθμού αλλοιώσεων ΝΕ ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό του εμβολιασμού με ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ					
	N	PN	P	M	PM
<b>Μ.Ο</b>	1,00±0,00 <sup>a</sup>	1,00±0,00 <sup>a</sup>	2,29±0,21 <sup>b</sup>	4,67±0,30 <sup>c</sup>	3,19±0,32 <sup>d</sup>

**Σημείωση:** <sup>a, b, c, d</sup> Μέσες τιμές με διαφορετικό εκθέτη διαφέρουν σημαντικά (P≤0.05).



**Διάγραμμα 2.29.** Ποσοστό ορνιθίων και βαθμός αλλοιώσεων ΝΕ ανά ομάδα κατά τον πειραματισμό του εμβολιασμού με ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο

Ο μ.ο. του βαθμού αλλοιώσεων NE στο έντερο των ορνιθίων των ομάδων N και PN ήταν 1 σε όλες τις δειγματοληψίες, υποδηλώνοντας ότι κανένα ορνίθιο δεν εμφάνισε αλλοιώσεις NE. Αντίθετα, ο μ.ο. του βαθμού αλλοιώσεων NE στο έντερο των ορνιθίων των ομάδων P, M και PM ήταν μεγαλύτερος από 1, υποδηλώνοντας ότι στα ορνίθια των παραπάνω ομάδων εκδηλώθηκαν αλλοιώσεις NE στον εντερικό βλεννογόνο. Ο μ.ο. του βαθμού αλλοιώσεων NE των μη μολυσμένων ομάδων ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) μικρότερος από το μ.ο. των μολυσμένων ομάδων. Επίσης, σημαντική ( $P \leq 0.05$ ) διαφορά υπήρχε και μεταξύ των μολυσμένων ομάδων. Συγκεκριμένα, η ομάδα M είχε σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) υψηλότερο μ.ο. από όλες τις μολυσμένες ομάδες ( $P \leq 0.05$ ) και η ομάδα PM σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) υψηλότερο από την ομάδα P.

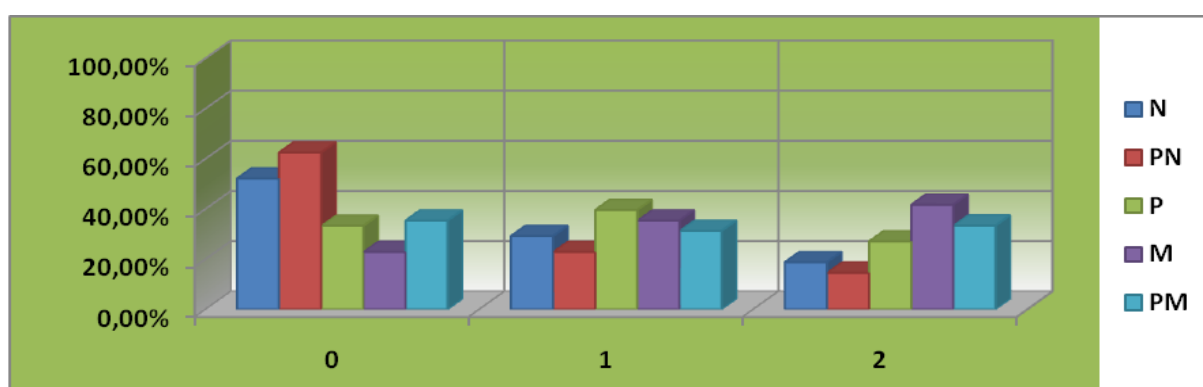
Πιο αναλυτικά, όπως φαίνεται και από τα στοιχεία του **πίνακα 2.43.**, η μικτή μόλυνση των ορνιθίων με *C. perfringens* και *E. maxima*, στα ορνίθια τα οποία δεν είχαν εμβολιαστεί, αύξησε τη σοβαρότητα και τη συχνότητα εμφάνισης αλλοιώσεων NE, συγκριτικά με τη μικτή μόλυνση με *C. perfringens* και δεκαπλάσια δόση ΕΛΔ αντικοκκιδιακού εμβολίου. Συγκεκριμένα, το ποσοστό των ορνιθίων χωρίς αλλοιώσεις NE στην ομάδα M ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) χαμηλότερο και το ποσοστό των ορνιθίων με το μέγιστο βαθμό αλλοιώσεων σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) υψηλότερο, ενώ στην ομάδα P παρατηρήθηκε η αντίθετη εικόνα.

Η εφαρμογή του αντικοκκιδιακού εμβολίου περιόρισε τόσο τη συχνότητα εμφάνισης όσο και τη σοβαρότητα των αλλοιώσεων NE μετά από μικτή μόλυνση των ορνιθίων με *C. perfringens* και *E. maxima*. Συγκεκριμένα, στην ομάδα PM το ποσοστό των ορνιθίων χωρίς αλλοιώσεις NE ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) υψηλότερο και το ποσοστό των ορνιθίων με το μέγιστο βαθμό αλλοιώσεων ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) χαμηλότερο, ενώ στην ομάδα M παρατηρήθηκε η αντίθετη εικόνα.

Το ποσοστό των ορνιθίων και ο βαθμός αλλοιώσεων του ήπατος, όπως πρόέκυψε μετά από τη μακροσκοπική του εξέταση, παρουσιάζονται αναλυτικά στον **πίνακα 2.45.**

**Πίνακας 2.45.** Ποσοστό ορνιθίων και βαθμός μακροσκοπικών αλλοιώσεων ήπατος ανά ομάδα κατά τον πειραματισμό του εμβολιασμού με ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ					
ΒΑΘΜΟΣ	N	PN	P	M	PM
0,00	52,1%	62,5%	33,3%	22,9%	35,4%
1,00	29,2%	22,9%	39,6%	35,4%	31,3%
2,00	18,8%	14,6%	27,1%	41,7%	33,4%
<b>ΣΥΝΟΛΙΚΑ</b>	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%



**Διάγραμμα 2.30.** Ποσοστό ορνιθίων και βαθμός μακροσκοπικών αλλοιώσεων ήπατος ανά ομάδα κατά τον πειραματισμό του εμβολιασμού με ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο

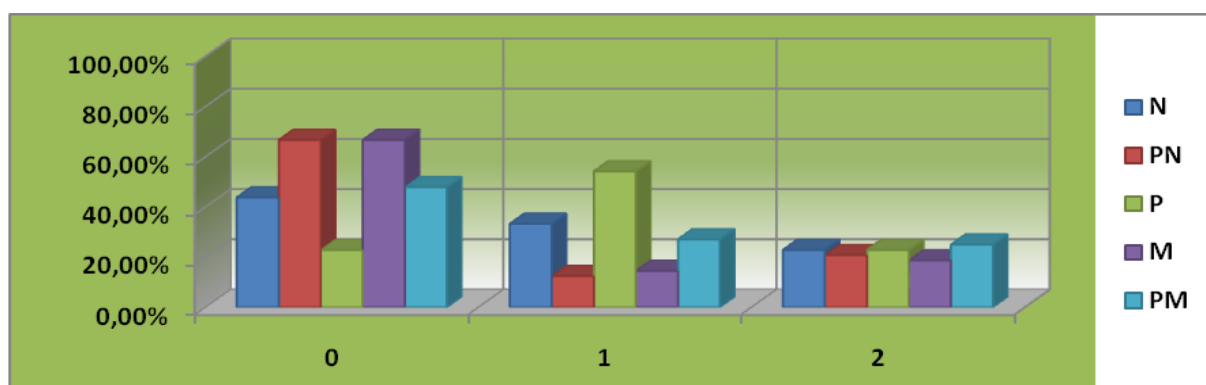
Η μακροσκοπική εξέταση του ήπατος έδειξε ότι τα περισσότερα ορνίθια με φυσιολογικό ήπαρ άνηκαν στις ομάδες που δεν μολύνθηκαν. Αντίθετα, οι ομάδες PM και M είχαν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) μεγαλύτερο ποσοστό ορνιθίων με μακροσκοπικές αλλοιώσεις μέγιστου βαθμού. Η ομάδα PN είχε σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) υψηλότερο ποσοστό ορνιθίων με φυσιολογικό ήπαρ, ενώ η ομάδα M είχε σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) χαμηλότερο ποσοστό ορνιθίων με φυσιολογικό ήπαρ.

Το ποσοστό των ορνιθίων και η συχνότητα εμφάνισης των αλλοιώσεων του μυώδους στομάχου, όπως πρόέκυψε μετά από τη μακροσκοπική του εξέταση, παρουσιάζονται αναλυτικά στον **πίνακα 2.46**.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

**Πίνακας 2.46.** Ποσοστό ορνιθίων και βαθμός μακροσκοπικών αλλοιώσεων μυώδους στομάχου ανά ομάδα κατά τον πειραματισμό του εμβολιασμού με ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ					
ΒΑΘΜΟΣ	N	PN	P	M	PM
0,00	43,8%	66,7%	22,9%	66,7%	47,9%
1,00	33,3%	12,5%	54,2%	14,6%	27,1%
2,00	22,9%	20,8%	22,9%	18,8%	25,0%
<b>ΣΥΝΟΛΙΚΑ</b>	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%



**Διάγραμμα 2.31.** Ποσοστό ορνιθίων και βαθμός αλλοιώσεων μυώδους στομάχου ανά ομάδα κατά τον πειραματισμό του εμβολιασμού με ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο

Η εφαρμογή του εμβολίου στα ορνίθια των ομάδων που δεν μολύνθηκαν μείωσε τη συχνότητα εμφάνισης των μακροσκοπικών αλλοιώσεων στο μυώδη στόμαχο. Συγκεκριμένα, στην ομάδα PN το ποσοστό των ορνιθίων με φυσιολογικό μυώδη στόμαχο ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) υψηλότερο.

Η μικτή μόλυνση των ορνιθίων με *C. perfringens* και *E. maxima* μείωσε τη συχνότητα εμφάνισης των μακροσκοπικών αλλοιώσεων στο μυώδη στόμαχο, συγκριτικά με τα ορνίθια τα οποία μολύνθηκαν με *C. perfringens* και δεκαπλάσια δόση αντικοκκιδιακού εμβολίου. Συγκεκριμένα, στην ομάδα P, το ποσοστό των ορνιθίων με φυσιολογικό μυώδη στόμαχο ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) χαμηλότερο, ενώ στην ομάδα M παρατηρήθηκε η αντίθετη εικόνα.

Η εφαρμογή του αντικοκκιδιακού εμβολίου αύξησε τη συχνότητα εμφάνισης των μακροσκοπικών αλλοιώσεων στο μυώδη στόμαχο μετά από μικτή μόλυνση των ορνιθίων με *C. perfringens* και *E. maxima*. Συγκεκριμένα, στην ομάδα M το ποσοστό των ορνιθίων με φυσιολογικό μυώδη στόμαχο ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) υψηλότερο, ενώ στην ομάδα PM παρατηρήθηκε η αντίθετη εικόνα.

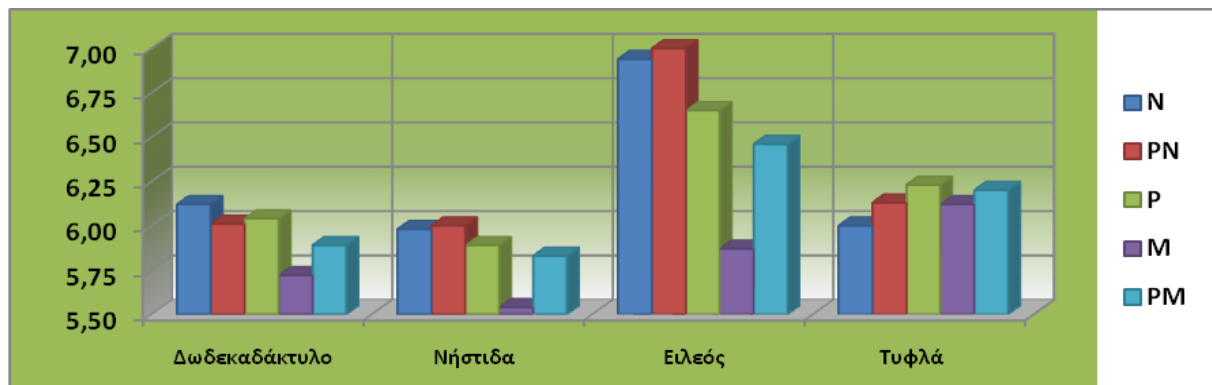
**2.5.4 Μέτρηση pH εντερικού περιεχομένου**

Τα αποτελέσματα της μέτρησης του pH του περιεχομένου των επιμέρους τμημάτων του γαστρεντερικού σωλήνα παρουσιάζονται στον **πίνακα 2.47**.

**Πίνακας 2.47.** pH του περιεχομένου στο δωδεκαδάκτυλο, τη νήστιδα, τον ειλέο και τα τυφλά ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό του εμβολιασμού με ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο ( $\bar{x} \pm SEM$ )

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ					
	N	PN	P	M	PM
Δωδεκαδάκτυλο	6,12±0,03 <sup>a</sup>	6,01±0,03 <sup>b</sup>	6,04±0,03 <sup>ab</sup>	5,72±0,06 <sup>c</sup>	5,89±0,04 <sup>d</sup>
Νήστιδα	5,97±0,02 <sup>a</sup>	6,00±0,02 <sup>a</sup>	5,89±0,02 <sup>b</sup>	5,54±0,07 <sup>c</sup>	5,83±0,03 <sup>b</sup>
Ειλεός	6,94±0,05 <sup>a</sup>	7,07±0,05 <sup>b</sup>	6,65±0,07 <sup>c</sup>	5,87±0,12 <sup>d</sup>	6,46±0,10 <sup>c</sup>
Τυφλά	6,00±0,06 <sup>a</sup>	6,13±0,07 <sup>a</sup>	6,23±0,08 <sup>a</sup>	6,12±0,06 <sup>a</sup>	6,20±0,07 <sup>a</sup>

**Σημείωση:** <sup>a, b, c, d</sup> Μέσες τιμές στην ίδια γραμμή με διαφορετικό εκθέτη διαφέρουν σημαντικά (P≤0.05).



**Διάγραμμα 2.32.** Μέση τιμή του pH του περιεχομένου στο δωδεκαδάκτυλο, τη νήστιδα, τον ειλέο και τα τυφλά ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό του εμβολιασμού με ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο

Η εφαρμογή του αντικοκκιδιακού εμβολίου προκάλεσε σημαντική (P≤0.05) μείωση του pH του περιεχομένου του δωδεκαδακτύλου και σημαντική (P≤0.05) αύξηση του pH του ειλεού στα ορνίθια τα οποία δεν μολύνθηκαν.

Η μόλυνση των ορνιθίων με *C. perfringens* και δεκαπλάσια δόση ΕΛΔ αντικοκκιδιακού εμβολίου μείωσε σημαντικά (P≤0.05) την τιμή του pH του περιεχομένου της νήστιδας και του ειλεού, συγκριτικά με τα ορνίθια τα οποία δεν μολύνθηκαν. Η μόλυνση των ορνιθίων με *C. perfringens* και *E. maxima* μείωσε σημαντικά (P≤0.05) την τιμή του pH του περιεχομένου του δωδεκαδακτύλου, της νήστιδας και του ειλεού, συγκριτικά με τα ορνίθια τα οποία δεν μολύνθηκαν.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η μικτή μόλυνση των ορνιθίων με *C. perfringens* και *E. maxima*, συγκριτικά με τη μόλυνση των ορνιθίων με *C. perfringens* και δεκαπλάσια δόση ΕΛΔ αντικοκκιδιακού εμβολίου οδήγησε σε σημαντική ( $P \leq 0.05$ ) μείωση του pH του περιεχομένου του δωδεκαδακτύλου, της νήστιδας και του ειλεού.

Ο εμβολιασμός των ορνιθίων με ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο περιόρισε σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) την πτώση του pH του περιεχομένου του δωδεκαδακτύλου, της νήστιδας και του ειλεού, μετά από μικτή μόλυνση των ορνιθίων με *C. perfringens* και *E. maxima*.

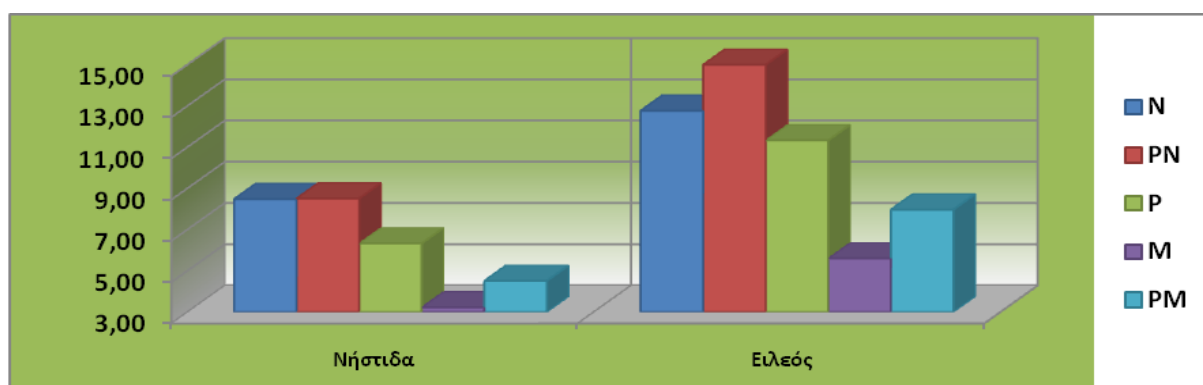
### 2.5.5 Μέτρηση ιξώδους εντερικού περιεχομένου

Τα αποτελέσματα της μέτρησης της τιμής του ιξώδους του περιεχομένου της νήστιδας και του ειλεού παρουσιάζονται στον **πίνακα 2.48**.

**Πίνακας 2.48.** Ιξώδες του περιεχομένου στη νήστιδα και τον ειλέο ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό του εμβολιασμού με ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ					
	N	PN	P	M	PM
Νήστιδα	8,48±0,55 <sup>a</sup>	8,51±0,44 <sup>a</sup>	6,33±0,42 <sup>b</sup>	3,23±0,40 <sup>c</sup>	4,51±0,46 <sup>d</sup>
Ειλεός	12,77±0,83 <sup>a</sup>	15,08±0,69 <sup>b</sup>	11,33±1,01 <sup>a</sup>	5,60±1,12 <sup>c</sup>	7,97±1,54 <sup>c</sup>

**Σημείωση:** <sup>a, b, c, d</sup> Μέσες τιμές στην ίδια γραμμή με διαφορετικό εκθέτη διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ).



**Διάγραμμα 2.33.** Μέση τιμή του ιξώδους του περιεχομένου στη νήστιδα και τον ειλέο ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό του εμβολιασμού με ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο

Η εφαρμογή του εμβολιασμού με ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο δεν επηρέασε το ιξώδες του περιεχομένου της νήστιδας, στα ορνίθια που δεν μολύνθηκαν, αλλά αύξησε σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) το ιξώδες του περιεχομένου του ειλεού, όπως φαίνεται από τη σύγκριση των ομάδων N και PN.

Η μόλυνση των ορνιθίων με *C. perfringens* και *E. maxima* ή δεκαπλάσια δόση ΕΛΔ αντικοκκιδιακού εμβολίου μείωσε σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) την τιμή του ιξώδους του περιεχομένου της νήστιδας. Η μόλυνση των ορνιθίων με *C. perfringens* και δεκαπλάσια δόση ΕΛΔ αντικοκκιδιακού εμβολίου μείωσε σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) την τιμή του ιξώδους του περιεχομένου του ειλεού.

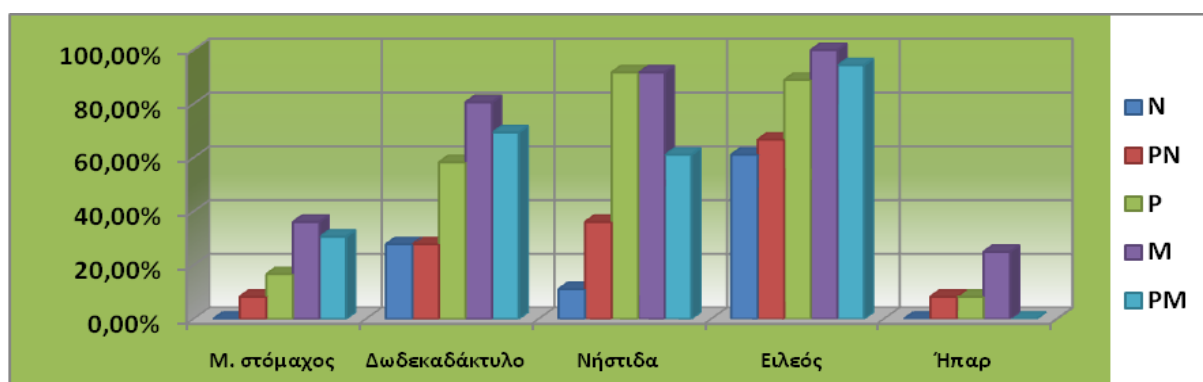
Ο εμβολιασμός των ορνιθίων με ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο περιόρισε σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) τη μείωση του ιξώδους του περιεχομένου της νήστιδας και σχετικά ( $P > 0.10$ ) του ειλεού, μετά από μικτή μόλυνση των ορνιθίων με *C. perfringens* και *E. maxima*.

### 2.5.6 Βακτηριολογική εξέταση

Το ποσοστό των ορνιθίων στα τμήματα από τα οποία απομονώθηκε το *C. perfringens* παρουσιάζεται αναλυτικά στον **πίνακα 2.49**.

**Πίνακας 2.49.** Ποσοστό απομόνωσης και εντόπιση *C. perfringens* ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό του εμβολιασμού με ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο

ΕΝΤΟΠΙΣΗ	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ				
	N	PN	P	M	PM
Μυώδης στόμαχος	0,0%	8,3%	16,7%	36,1%	30,6%
Δωδεκαδάκτυλο	27,8%	27,8%	58,3%	80,6%	69,4%
Νήστιδα	11,1%	36,1%	91,7%	91,7%	61,1%
Ειλεός	61,1%	66,7%	88,9%	100,0%	94,4%
Ήπαρ	0,0%	8,3%	8,3%	25,0%	0,0%



**Διάγραμμα 2.34.** Ποσοστό απομόνωσης και εντόπιση *C. perfringens* ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό του εμβολιασμού με ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο



## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Το ποσοστό των ορνιθίων από τα οποία απομονώθηκε το *C. perfringens* στο γαστρεντερικό σωλήνα ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) μικρότερο στην ομάδα N, υποδηλώνοντας την επιτυχία της μόλυνσης.

Στις μη μολυσμένες ομάδες, το ποσοστό απομόνωσης του *C. perfringens* από τη νήστιδα ήταν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) μεγαλύτερο στα ορνίθια της ομάδας που εμβολιάστηκαν, συγκριτικά με τα ορνίθια που δεν εμβολιάστηκαν. Στο δωδεκαδάκτυλο και τον ειλέο δεν παρατηρήθηκε διαφορά μεταξύ των ομάδων.

Η μόλυνση των ορνιθίων με *C. perfringens* και *E. maxima* αύξησε σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) τη συχνότητα απομόνωσης του *C. perfringens* από το μύδι στομάχο, το δωδεκαδάκτυλο και το ήπαρ, συγκριτικά με τη μόλυνση των ορνιθίων με *C. perfringens* και δεκαπλάσια δόση ΕΛΔ αντικοκκιδιακού εμβολίου.

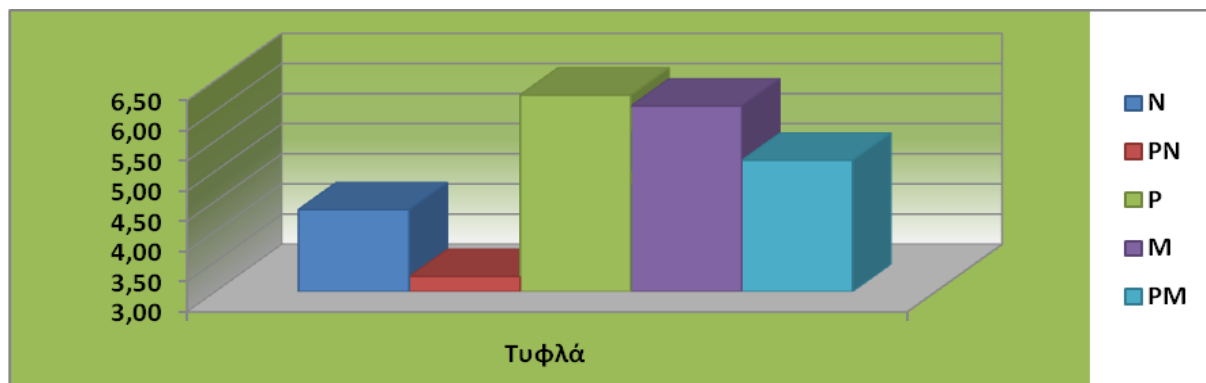
Ο εμβολιασμός των ορνιθίων με ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο περιόρισε σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) τη συχνότητα απομόνωσης του *C. perfringens* από τη νήστιδα και το ήπαρ, μετά από μικτή μόλυνση με *C. perfringens* και *E. maxima*.

Τα αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού του *C. perfringens* στα τυφλά παρουσιάζονται στον **πίνακα 2.50.**, εκφρασμένα σε cfu/g τυφλών μετά τη μετατροπή τους σε δεκαδικό λογάριθμο.

**Πίνακας 2.50.** Πληθυσμός ( $\log_{10}$ ) του *C. perfringens* εκφρασμένος σε cfu/g τυφλών ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό του εμβολιασμού με ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ					
	N	PN	P	M	PM
$\text{Log}_{10} C. perfringens$	4,36±0,17 <sup>a</sup>	3,25±0,27 <sup>b</sup>	6,26±0,19 <sup>c</sup>	6,08±0,28 <sup>c</sup>	5,18±0,22 <sup>d</sup>

Σημείωση: <sup>a, b, c, d</sup> Μέσες τιμές με διαφορετικό εκθέτη διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ).



**Διάγραμμα 2.35.** Μέσος πληθυσμός ( $\log_{10}$ ) του *C. perfringens* εκφρασμένος σε cfu/g τυφλών ανά ομάδα ορνιθίων κατά τον πειραματισμό του εμβολιασμού με ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο

Οι μολυσμένες ομάδες είχαν σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) υψηλότερο πληθυσμό *C. perfringens* στα τυφλά, συγκριτικά με τις μη μολυσμένες ομάδες, υποδηλώνοντας την επιτυχία της μόλυνσης.

Στα ορνίθια των ομάδων που δεν μολύνθηκαν ο εμβολιασμός με ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο περιόρισε σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) τον πληθυσμό του *C. perfringens* στα τυφλά.

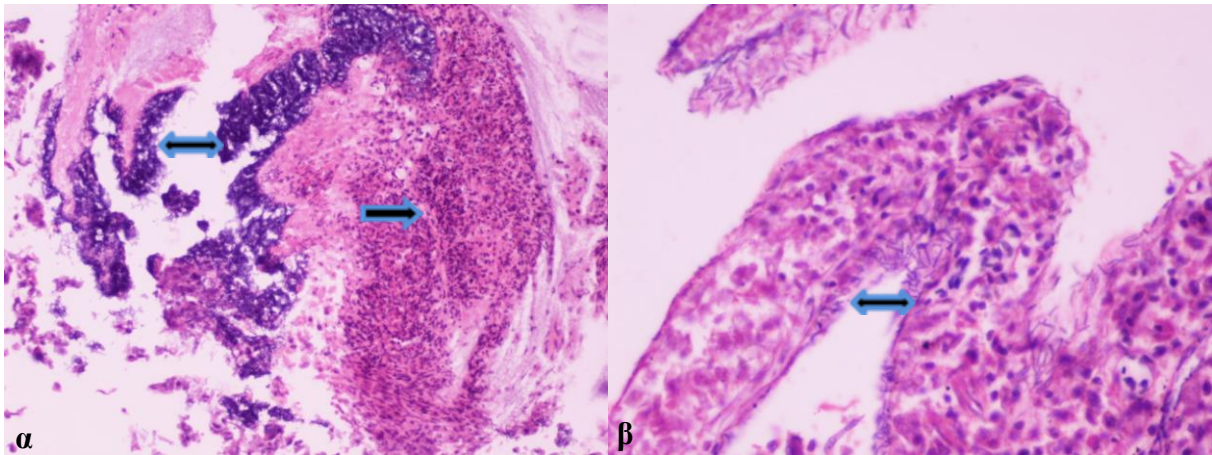
Τόσο η μικτή μόλυνση των ορνιθίων με *C. perfringens* και *E. maxima* όσο και η μόλυνση με *C. perfringens* και δεκαπλάσια δόση ΕΛΔ αντικοκκιδιακού εμβολίου προκάλεσε σημαντική ( $P \leq 0.05$ ) αύξηση του πληθυσμού του *C. perfringens* στα τυφλά, η οποία όμως δεν διέφερε σημαντικά ( $P > 0.10$ ) μεταξύ των δύο αυτών ομάδων.

Η εφαρμογή του ΕΛΔ αντικοκκιδιακού εμβολίου μετά από τη μικτή μόλυνση των ορνιθίων με *C. perfringens* και *E. maxima* περιόρισε σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) την αύξηση του πληθυσμού του *C. perfringens* στα τυφλά.

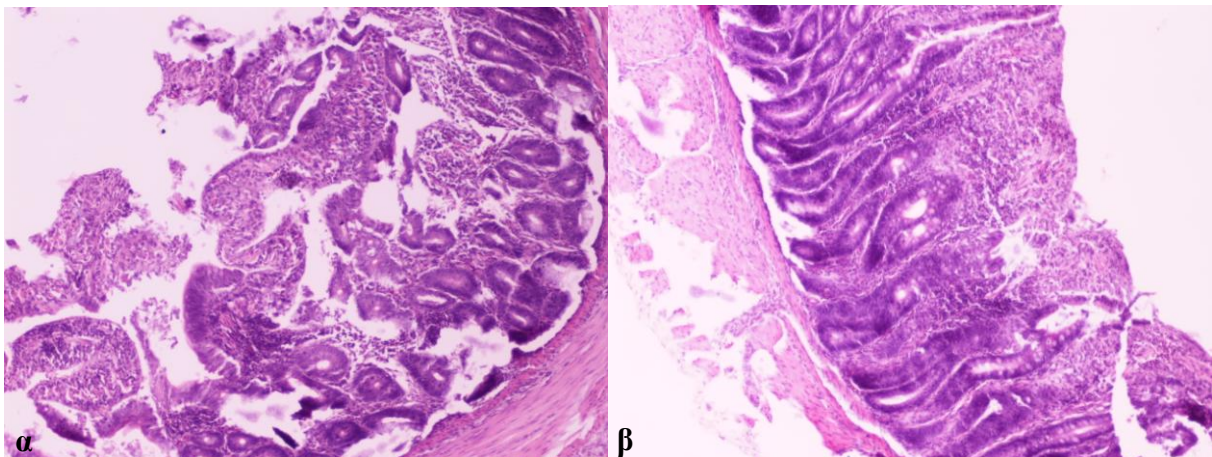
### **2.6. Ιστοπαθολογική εξέταση**

Η ιστοπαθολογική εικόνα των τομών παραφίνης των ιστοτεμαχίων που προερχόταν από τα πειραματόζωα όλων των ομάδων με μακροσκοπική εικόνα ΝΕ ήταν παρόμοια και κατέδειξε την παρουσία αλλοιώσεων που εντοπίζονταν κυρίως στη νήστιδα και τον ειλεό, ενώ στο δωδεκαδάκτυλο ήταν πολύ πιο ήπιες και οι οποίες συνέθεταν την εικόνα της ΝΕ. Οι αλλοιώσεις αυτές χαρακτηρίζονταν από εκφύλιση και νέκρωση του εντερικού βλεννογόνου, με αποτέλεσμα οι εντερικές λάχνες να έχουν χάσει το φυσιολογικό τους ύψος και να εμφανίζονται ενωμένες. Κυτταρικά ράκη εντοπίζονταν στον εντερικό αυλό αλλά και στην επιφάνεια του νεκρωμένου εντερικού βλεννογόνου. Στο χόριο του βλεννογόνου, διαπιστώθηκε έντονη φλεγμονώδης αντίδραση, η οποία χαρακτηριζόταν από τη διήθηση κυρίως ετερόφιλων κοκκιοκυττάρων και λεμφοκυττάρων. Χαρακτηριστική παρουσία βακτηρίων μεμονωμένων ή/και συναθροίσεων αυτών διαπιστώθηκε τόσο στον εντερικό αυλό, μαζί με κυτταρικά ράκη, όσο και στον εντερικό βλεννογόνο και στο χόριο. Διαπιστώθηκε επίσης η παρουσία κοκκιδίων του γένους *Eimeria* spp. σε διάφορα εξελικτικά στάδια του πολλαπλασιασμού τους και ιδιαίτερα σχιστά.

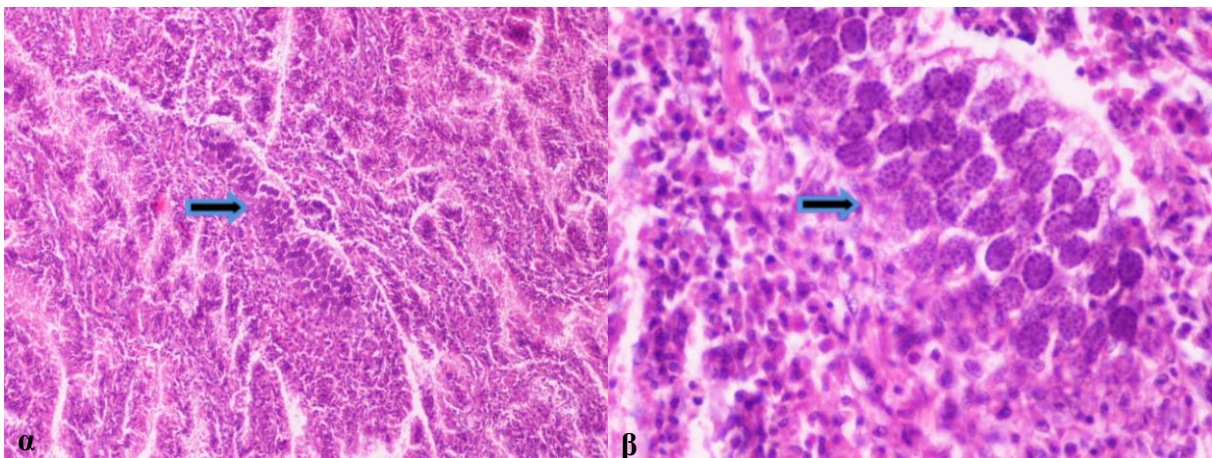
Αναφορικά με την ιστοπαθολογική εικόνα των τομών παραφίνης των ιστοτεμαχίων του ήπατος, αυτή χαρακτηριζόταν από ήπια εκφύλιση των ηπατικών κυττάρων και εστιακή ενεργοποίηση των κυττάρων του Kupffer.



**Εικόνα 2.4.** Εγκάρσια τομή νήστιδας κρεοπαραγωγού ορνιθίου ηλικίας 23 ημερών, μετά από μικτή μόλυνση με *C. perfringens* και *Eimeria* spp. Παρατηρείται έντονη φλεγμονώδης αντίδραση, με παρουσία ετερόφιλων κοκκιοκυττάρων και λεμφοκυττάρων, καθώς επίσης *C. perfringens* τόσο σε συναθροίσεις (α) όσο και μεμονωμένα (β). (H&E, α x 100, β x 400).



**Εικόνα 2.5.** Εγκάρσια τομή νήστιδας κρεοπαραγωγού ορνιθίου ηλικίας 23 ημερών, μετά από μικτή μόλυνση με *C. perfringens* και *Eimeria* spp. Παρατηρείται απώλεια της αρχιτεκτονικής δομής του βλεννογόνου με κατάρτιση των εντερικών λαχνών (α) ή/και συνένωση των εντερικών λαχνών (β). (H&E, x 100).



**Εικόνα 2.6.** Εγκάρσια τομή νήστιδας ορνιθίου ηλικίας 23 ημερών, μετά από μικτή μόλυνση με *C. perfringens* και *Eimeria* spp. Παρατηρείται συνάθροιση άφθονων σχιστών *Eimeria* spp., καθώς επίσης έντονη φλεγμονώδης αντίδραση, με παρουσία ετερόφιλων κοκκιοκυττάρων και λεμφοκυττάρων. (H&E, α x 100, β x 400).



### **3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

#### **3.1 Πειραματισμός φυσικού περιορισμού της διατροφής**

Το ΣΒ των πτηνών σε όλες τις ομάδες, πριν τη μόλυνση και το φυσικό περιορισμό της διατροφής, κυμαινόταν στα ίδια επίπεδα. Αυτό οφείλεται στην κοινή πηγή προέλευσης των νεοσσών και στις παρόμοιες συνθήκες εκτροφής (διατροφή, πρόγραμμα φωτισμού, φόρτιση δαπέδου, θερμοκρασία, υγρασία, εξαερισμός). Επίσης, τα ορνίθια έως αυτή την ηλικία δεν έχουν υποστεί κάποιο πειραματικό χειρισμό.

Ο ΔΜΤ ήταν πολύ υψηλός σε όλες τις ομάδες, ιδιαίτερα πριν τους πειραματικούς χειρισμούς. Αυτό οφείλεται στην ιδιαίτερη σύνθεση του σιτηρεσίου, το οποίο περιείχε μεγάλες ποσότητες δημητριακών καρπών, πλούσιων σε ΜΣΠ, με στόχο την προδιάθεση στην εκδήλωση της ΝΕ, καθώς και στην απώλεια τροφής από τις τροφοδόχους. Οι ΜΣΠ αποτελούν μία ετερογενή ομάδα πολυσακχαριτών, οι οποίοι δεν μπορούν να διασπαστούν από τα ένζυμα του πεπτικού συστήματος των πτηνών (Iji και Tivey, 1998: Juskiewicz και συν., 2004). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, η υψηλή περιεκτικότητα του σιτηρεσίου σε ΜΣΠ να προκαλεί μεταβολές στο περιβάλλον του γαστρεντερικού σωλήνα και να διαταράσσει την αρμονική ισορροπία της εντερικής μικροχλωρίδας. Ταυτόχρονα, οι ΜΣΠ προκαλούν αύξηση του ιξώδους (Acamovic, 2001: Choct, 2001, Horwood και συν., 2004) και του χρόνου διαβατότητας του εντερικού περιεχομένου (Gohl και Gohl, 1977: Jia και συν., 2009). Η αύξηση του ιξώδους μειώνει την πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών (Langhout και συν., 2000: Choct, 2001: Horwood και συν., 2004). Η μετάβαση από το σιτηρέσιο Β στο σιτηρέσιο Γ, το οποίο περιείχε ως πηγή πρωτεϊνών το ιχθυάλευρο αντί της σόγιας, βελτίωσε το ΔΜΤ. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το ιχθυάλευρο αποτελεί πηγή πρωτεϊνών ζωικής προέλευσης, οι οποίες αξιοποιούνται καλύτερα από τα πτηνά, συγκριτικά με τις πρωτεΐνες φυτικής προέλευσης (Dahiya, 2007).

Η μείωση του ΣΒ και η βελτίωση του ΔΜΤ που παρατηρήθηκε στα πτηνά που υπέστησαν φυσικό περιορισμό της διατροφής είναι σύμφωνη με τα ευρήματα της μελέτης των Lee και Leeson (2001). Ο περιορισμός της διατροφής εφαρμόζεται στα κρεοπαραγωγά ορνίθια, με στόχο τη βελτίωση του ΔΜΤ και την εκμετάλλευση της αντισταθμιστικής αύξησης (Shariatmadari και Torshizi, 2004). Στην αρχή, ο περιορισμός της διατροφής έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του ΣΒ, λόγω της μειωμένης κατανάλωσης τροφής. Στη συνέχεια όμως, με την επαναφορά της φυσιολογικής διατροφής και την πάροδο της ηλικίας, το ΣΒ των πτηνών αποκαθίσταται, έως την ηλικία κατά τη σφαγή, λόγω της εκδήλωσης της

αντισταθμιστικής αύξησης. Ωστόσο, στη δική μας έρευνα δεν παρατηρήθηκε αντισταθμιστική αύξηση του ΣΒ. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το χρονικό διάστημα που απέμενε από την αποκατάσταση της φυσιολογικής διατροφής έως τη ζύγιση ήταν πολύ μικρό.

Η διαπίστωση της ύπαρξης μακροσκοπικών και μικροσκοπικών αλλοιώσεων NE, η οποία συμφωνεί με παρόμοια ευρήματα από τη διεθνή βιβλιογραφία (Al-Sheikhly και Truscott, 1977 α, β; Fukata και συν., 1988), επιβεβαιώνουν την επιτυχία της μικτής μόλυνσης με *C. perfringens* και δεκαπλάσια δόση ΕΛΔ αντικοκκιδιακού εμβολίου και καταδεικνύουν την αποτελεσματικότητα του πειραματικού μοντέλου που χρησιμοποιήθηκε για την αναπαραγωγή της.

Από την ποιοτική και ποσοτική στατιστική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων προκύπτει ότι ο φυσικός περιορισμός της διατροφής προκάλεσε σημαντική μείωση της σοβαρότητας των αλλοιώσεων NE στο έντερο. Επίσης, ο φυσικός περιορισμός περιόρισε τη σοβαρότητα και τη συχνότητα εμφάνισης των μακροσκοπικών αλλοιώσεων στο ήπαρ και το μυώδη στόμαχο και μείωσε τον πληθυσμό του *C. perfringens* στα τυφλά. Από όλα τα παραπάνω, συμπεραίνεται ότι ο φυσικός περιορισμός της διατροφής ασκεί προστατευτική δράση κατά της NE στα κρεοπαραγωγά ορνίθια.

Η προστατευτική δράση του φυσικού περιορισμού της διατροφής στην εμφάνιση της NE πιθανόν εκδηλώνεται μέσα από δύο αλληλοεξαρτώμενους μηχανισμούς που παρατηρούνται σε καταστάσεις περιορισμού της διατροφής, δηλαδή τις ενδοκρινολογικές μεταβολές και τη διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος (Goddeeris και συν., 2002; Webster, 2003; Hangalapura και συν., 2006). Ο φυσικός περιορισμός της διατροφής προκαλεί αύξηση της συγκέντρωσης των γλυκοκορτικοειδών, του γλουκαγόνου, της ινσουλίνης και της αυξητικής ορμόνης (Hocking και συν., 1993; Bruggeman και συν., 1997; De Jong και συν., 2002) και μείωση της τριωδοθυρονίνης ( $T_3$ ), της θυροξίνης ( $T_4$ ) και των αυξητικών παραγόντων τύπου ινσουλίνης (IGF- I και II) (Leili και συν., 1997; Zhan και συν., 2007), με αποτέλεσμα τη μείωση της γλυκόζης και των λιπαρών οξέων στον ορό του αίματος.

Η αύξηση της συγκέντρωσης των γλυκοκορτικοειδών οδηγεί στην αποκόλληση των ετερόφιλων κυττάρων από το ενδοθήλιο των αγγείων και τη μετανάστευσή τους στους ιστούς (Gross και Siegel, 1988; Zulkifli και συν., 1995). Στα πτηνά, τα οποία έχουν υποστεί περιορισμό της διατροφής, η αναλογία E/Λ είναι επίσης αυξημένη (Zulkifli και συν., 2000; Jones και συν., 2004).

Επιπλέον, τα γλυκοκορτικοειδή ασκούν σημαντική επίδραση στην έκφραση γονιδίων, τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή κυτοκινών και άλλων παραγόντων που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοσολογική διέγερση. Η αυξημένη συγκέντρωση των

γλυκοκορτικοειδών προκαλεί μείωση της συγκέντρωσης της φωσφολιπάσης A<sub>2</sub>, η οποία με τη σειρά της προκαλεί μείωση της συγκέντρωσης του αραχιδονικού οξέος, των προσταγλαδινών και των λευκοτριενίων με αποτέλεσμα την καταστολή της φλεγμονής (Goddeeris και συν., 2002).

Ο περιορισμός της διατροφής στα πτηνά προκαλεί διέγερση των μηχανισμών της χυμικής ανοσίας, προκαλώντας αύξηση του τίτλου των αντισωμάτων (Klasing, 1988: Boa-Amponsem και συν., 1997). Συγκεκριμένα, ο τίτλος των αντισωμάτων μετά από ενοφθαλμισμό με SRBC ήταν μεγαλύτερος στα πτηνά τα οποία είχαν υποστεί περιορισμό της διατροφής, συγκριτικά με τα πτηνά στα οποία η κατανάλωση τροφής γινόταν κατά βούληση και μάλιστα ο τίτλος των αντισωμάτων ήταν ανάλογος του χρόνου περιορισμού της διατροφής (Boa-Amponsem και συν., 1997).

Η επιβράδυνση του μεταβολισμού και της ανάπτυξης (Zubair και Leeson, 1994), καθώς και η ευεργετική επίδραση στο καρδιαγγειακό σύστημα που ασκεί ο φυσικός περιορισμός στα σύγχρονα κρεοπαραγωγά ορνίθια (Balog και συν., 2000), πιθανόν να συνέβαλαν στην προστασία έναντι της NE, βελτιώνοντας την κυκλοφορία του αίματος και διευκολύνοντας τη μετανάστευση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος στο γαστρεντερικό βλεννογόνο.

Οι μακροσκοπικές αλλοιώσεις του μυώδους στομάχου έχουν συσχετιστεί με υψηλό πληθυσμό *C. perfringens* στα τυφλά (Novoa-Garrido και συν., 2006). Τα αποτελέσματα της δικής μας έρευνας συμφωνούν με τους Novoa-Garrido και συν. (2006), καθώς ο φυσικός περιορισμός της διατροφής μείωσε σημαντικά τον πληθυσμό του *C. perfringens* στα τυφλά και παράλληλα περιόρισε τη σοβαρότητα των μακροσκοπικών αλλοιώσεων του μυώδους στομάχου.

Ο περιορισμός της διατροφής, εκτός από την επίδραση στο ενδοκρινικό και στο ανοσοποιητικό σύστημα, επηρεάζει σημαντικά και την εντερική μικροχλωρίδα (Thompson και συν., 2008). Λόγω της στενής σχέσης μεταξύ της διατροφής και της εντερικής μικροχλωρίδας, οποιαδήποτε μεταβολή της πρώτης προκαλεί ποιοτικές και ποσοτικές μεταβολές στη μικροχλωρίδα. Η μείωση του πληθυσμού του *C. perfringens* στα τυφλά των πτηνών των ομάδων όπου περιορίστηκε η διατροφή είναι σύμφωνη με τη μελέτη των Schneider και συν. (2000), η οποία διεξήχθη σε ανθρώπους και παρατηρήθηκε μείωση του αριθμού των αερόβιων και αναερόβιων βακτηρίων, πιθανόν λόγω της μείωσης των διαθέσιμων θρεπτικών συστατικών του σιτηρεσίου.

Στη μείωση του πληθυσμού του *C. perfringens* στα τυφλά των πτηνών των ομάδων όπου περιορίστηκε η διατροφή, εκτός από την άμεση στέρση των θρεπτικών συστατικών



του σιτηρεσίου, πιθανόν να συνέβαλε και η μείωση της ποσότητας της βλέννης που παρατηρείται σε καταστάσεις στέρησης τροφής (Smirnov και συν., 2004: Thompson και Applegate, 2006). Το *C. perfringens* ανήκει στα βλεννολυτικά βακτήρια, έχει δηλαδή την ικανότητα να διασπά τη βλέννη που εκκρίνει ο γαστρεντερικός βλεννογόνο και να τη χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα για την ανάπτυξή του, υπερτερώντας έναντι άλλων βακτηρίων που δεν έχουν τη δυνατότητα αυτή (De Plancke και συν., 2002).

Οι μικροβιακές ζυμώσεις που παρατηρούνται στο γαστρεντερικό σωλήνα έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή πτητικών λιπαρών οξέων, τα οποία διαμορφώνουν και την τιμή του pH του εντερικού περιεχομένου (Gabriel και συν., 2006). Ο φυσικός περιορισμός της διατροφής, λόγω της επίδρασης στην εντερική μικροχλωρίδα, μετέβαλε την τιμή του pH στα διάφορα τμήματα του γαστρεντερικού σωλήνα. Σύμφωνα με τους Hinton και συν. (2000), ο φυσικός περιορισμός της διατροφής έχει μεγαλύτερη επίδραση στον πρόλοβο και το λεπτό έντερο και μικρότερη στα τυφλά, λόγω της άμεσης στέρησης των θρεπτικών συστατικών στο λεπτό έντερο και του σχετικά σταθερού περιβάλλοντος που παρατηρείται στα τυφλά. Η πτώση του pH που παρατηρείται στα πτηνά, όπου εφαρμόστηκε ο περιορισμός της διατροφής, σε όλα τα τμήματα του λεπτού εντέρου και ιδιαίτερα στη νήστιδα και τον ειλεό, πιθανόν να οφείλεται στην αυξημένη παραγωγή ΠΛΟ από τα επωφελή βακτήρια της εντερικής μικροχλωρίδας, όπως το *Bifidobacterium* spp.

Η ανάπτυξη επωφελών βακτηρίων της εντερικής μικροχλωρίδας και η μείωση της τιμής του pH πιθανόν να αποτελεί έναν ακόμη μηχανισμό, μέσω του οποίου ο φυσικός περιορισμός περιορίζει τη σοβαρότητα και τη συχνότητα εμφάνισης των αλλοιώσεων NE, επειδή το όξινο περιβάλλον αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα για την ανάπτυξη του *C. perfringens* (McReynolds και συν., 2007).

Η μείωση της τιμής του pH του εντερικού περιεχομένου που παρατηρείται στις μολυσμένες ομάδες οφείλεται στις αλλοιώσεις κοκκιδίωσης και NE που εκδηλώθηκαν, λόγω της μικτής μόλυνσης που διενεργήθηκε για την πειραματική αναπαραγωγή της NE (Ruff και συν., 1974: Shane και συν., 1985). Η μείωση είναι εντονότερη στη νήστιδα και τον ειλεό, τα οποία αποτελούν το σημείο εντόπισης των αλλοιώσεων της NE (Al-Sheikhly και Truscott, 1977α).

Η τιμή του ιξώδους του περιεχομένου της νήστιδας όλων των ομάδων είναι μικρότερη από ότι του ειλεού. Το εύρημα αυτό είναι φυσιολογικό και σύμφωνο με τα αποτελέσματα της μελέτης των Petersen και συν. (1999), επειδή καθώς το εντερικό περιεχόμενο προωθείται από εμπρός προς τα πίσω τα θρεπτικά συστατικά διασπώνται από τη δράση των πεπτικών ενζύμων και μαζί με το νερό απορροφώνται από τον εντερικό βλεννογόνο, με αποτέλεσμα τη

συμπύκνωση του περιεχομένου. Η τιμή του ιξώδους του εντερικού περιεχομένου ποικίλει από πτηνό σε πτηνό (Choct, 2006), επειδή επηρεάζεται σημαντικά από την πρόσληψη τροφής, την κατανάλωση νερού, τις παγκρεατικές εκκρίσεις και τη σύνθεση του σιτηρεσίου (Bedford και Schulze, 1998).

Η τιμή του ιξώδους του περιεχομένου της νήστιδας και του ειλεού όλων των ομάδων, στη δική μας έρευνα, ήταν υψηλή. Αυτό οφείλεται στην αυξημένη περιεκτικότητα του σιτηρεσίου σε σιτάρι και σίκαλη, τα οποία περιείχαν υψηλές συγκεντρώσεις ΜΣΠ (Branton και συν., 1987; Riddell και Kong, 1992). Οι ΜΣΠ δεν διασπώνται από τα ένζυμα του πεπτικού συστήματος των πτηνών, με αποτέλεσμα την αύξηση του ιξώδους (Iji και Tivey, 1998; Juskiewicz και συν., 2004) και την προδιάθεση στη εκδήλωση της NE (Kaldhusdal και Skjerve, 1996). Η αύξηση του ιξώδους του εντερικού περιεχομένου λειτουργεί ως μηχανικός φραγμός ανάμεσα στα ένζυμα του πεπτικού συστήματος και τα συστατικά του σιτηρεσίου, με αποτέλεσμα την ατελή διάσπασή τους και την περιορισμένη απορρόφησή τους από τον εντερικό βλεννογόνο. Η αύξηση της διαθεσιμότητας των θρεπτικών συστατικών στο οπίσθιο τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα, λόγω της ατελούς διάσπασης, ευνοεί τον πολλαπλασιασμό των υποχρεωτικά αναερόβιων βακτηρίων και των εντεροβακτηρίων, δημιουργώντας τις κατάλληλες συνθήκες για την ανάπτυξη του *C. perfringens* (Vahjen και συν., 1998). Η μείωση της τιμής ιξώδους του περιεχομένου της νήστιδας πιθανόν να αποτελεί έναν ακόμη μηχανισμό, μέσα από τον οποίο ο φυσικός περιορισμός της διατροφής εκδηλώνει την προστατευτική του δράση κατά της NE.

Η πτώση της τιμής του ιξώδους του περιεχομένου της νήστιδας που παρατηρείται στα πτηνά των ομάδων που μολύνθηκαν οφείλεται στις αλλοιώσεις κοκκιδίωσης και NE που εκδηλώθηκαν, λόγω της μικτής μόλυνσης (Waldenstedt και συν., 2000). Η μείωση του ιξώδους είναι αποτέλεσμα ωσμωτικών και απορροφητικών μεταβολών, λόγω των αλλοιώσεων του γαστρεντερικού βλεννογόνου (Crompton, 1976).

Ανακεφαλαιωτικά, ο φυσικός περιορισμός της διατροφής εκδήλωσε προστατευτική δράση κατά της NE, δεδομένου ότι μειώθηκε ο πληθυσμός του *C. perfringens* στα τυφλά και κυρίως περιορίστηκε η σοβαρότητα εμφάνισης των αλλοιώσεων NE. Οι πιθανότεροι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην προστατευτική δράση κατά της NE είναι οι ενδοκρινολογικές μεταβολές, η διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος, η ποσοτική και ποιοτική μείωση της εντερικής μικροχλωρίδας και η μεταβολή των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του εντερικού περιεχομένου.

### **3.2 Πειραματισμός αυξημένης φόρτισης δαπέδου**

Η αύξηση της φόρτισης δαπέδου δεν επηρέασε το ΣΒ σε κανένα στάδιο της πειραματικής διαδικασίας, σε αντίθεση με τους Proudfoot και συν. (1979), οι οποίοι παρατήρησαν μείωση του ΣΒ με την αύξηση της φόρτισης δαπέδου. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι η διάρκεια του πειραματισμού ήταν μόνο 24 ημέρες και το ΣΒ ήταν κατά πολύ χαμηλότερο, συγκριτικά με το ΣΒ στην ηλικία κατά τη σφαγή. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα να μην εκδηλωθεί πλήρως η αρνητική επίδραση της αυξημένης φόρτισης στη διαμόρφωση του ΣΒ.

Στη δική μας έρευνα η αύξηση της φόρτισης δαπέδου μέχρι την ηλικία των 24 ημερών βελτίωσε το ΔΜΤ. Αυτό είναι σύμφωνο με τα αποτελέσματα της μελέτης των Dozier και συν. (2006) και οφείλεται στο μικρό ΣΒ και μέγεθος των πτηνών σε αυτή τη νεαρή ηλικία, καθώς επίσης στον περιορισμό των απωλειών θερμότητας που προκαλεί η αύξηση της φόρτισης δαπέδου. Συγκεκριμένα, τα πτηνά που βρίσκονται σε υψηλή φόρτιση, καταναλώνουν λιγότερη ενέργεια για θερμορύθμιση, εξαιτίας της μεταφοράς θερμότητας με αγωγή μεταξύ τους. Επίσης, στη δική μας έρευνα η αύξηση της φόρτισης περιόρισε την απώλεια της τροφής από τις τροφοδόχους, ενώ επιπλέον παρατηρήθηκε κατανάλωση τροφής απευθείας από τη στρωμνή που βρισκόταν περιφερικά των τροφοδόχων.

Η αύξηση της φόρτισης δαπέδου αύξησε σημαντικά τη σοβαρότητα και τη συχνότητα εμφάνισης των αλλοιώσεων NE, μετά την πειραματική μόλυνση των πτηνών με *C. perfringens* και *Eimeria* spp. Η επίδραση της αυξημένης φόρτισης δαπέδου στην εκδήλωση της NE φαίνεται και από την αύξηση του πληθυσμού του *C. perfringens* στα τυφλά, καθώς και από την αυξημένη συχνότητα απομόνωσης *C. perfringens* από το ήπαρ. Στα πτηνά με σοβαρές αλλοιώσεις NE, ο γαστρεντερικός βλεννογόنيος φραγμός καταρρίπτεται, με αποτέλεσμα τα βακτήρια του γαστρεντερικού σωλήνα να εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος και μέσω της πυλαίας κυκλοφορίας να φθάνουν στο ήπαρ (Lovland και Kaldhusdal, 2001).

Η αυξημένη φόρτιση δαπέδου διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της NE, λόγω της ψυχολογικής καταπόνησης και της ανοσοκαταστολής που παρατηρείται σε καταστάσεις αυξημένης φόρτισης δαπέδου. Σύμφωνα με τους Heckert και συν. (2002), η αυξημένη φόρτιση δαπέδου προκαλεί μείωση του μεγέθους του θυλάκου του Fabricius, με αποτέλεσμα τη μειωμένη χυμική ανοσολογική αντίδραση του οργανισμού.

Η επίδραση της αυξημένης φόρτισης στην παθογένεια της NE πιθανόν να οφείλεται και στη μεταβολή των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών και της μικροβιακής σύστασης της

στρωμνής που αυτή προκαλεί (Sorensen και συν., 2000; Lovanh και συν., 2007). Το μικροβιακό φορτίο της στρωμνής ανέρχεται στις  $10^{10}$ - $10^{11}$  cfu/g στρωμνής (Lovanh και συν., 2007; Rothrock και συν., 2007) και ο πληθυσμός του *C. perfringens* ανέρχεται στις  $10^5$ - $10^6$  cfu/g στρωμνής (Garrido και συν., 2004), αποτελώντας σημαντική πηγή μόλυνσης για τα πτηνά. Η αύξηση της υγρασίας, της θερμοκρασίας, του pH και της αμμωνίας της στρωμνής που προκαλεί η αυξημένη φόρτιση ευνοούν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό του *C. perfringens*, συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στην αύξηση του πληθυσμού του στο γαστρεντερικό σωλήνα των πτηνών και στην εκδήλωση της NE.

Το pH του εντερικού περιεχομένου καθορίζεται κυρίως από τις γαστρεντερικές εκκρίσεις και τα ΠΛΟ, τα οποία παράγονται κατά τις μικροβιακές ζυμώσεις. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, η σύσταση της εντερικής μικροχλωρίδας να επηρεάζει σημαντικά την τιμή του pH, στα τμήματα εκείνα όπου ο μικροβιακός πληθυσμός είναι υψηλός, όπως η νήστιδα, ο ειλεός και κυρίως τα τυφλά. Η αυξημένη φόρτιση δαπέδου προκαλεί μεταβολή των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών της στρωμνής και ιδιαίτερα μεταβολή της υγρασίας, της θερμοκρασίας, του pH και της συγκέντρωσης αμμωνίας, με αποτέλεσμα να επηρεάζει τη μικροβιακή σύσταση της στρωμνής (Lovanh και συν., 2007). Η στρωμνή αποτελεί σημαντική πηγή μόλυνσης για τα πτηνά, με αποτέλεσμα η μεταβολή της μικροβιακής της σύνθεσης να επηρεάζει τη σύνθεση της εντερικής μικροχλωρίδας των πτηνών, γεγονός που φαίνεται από τη μεταβολή του pH στην ομάδα των πτηνών με την υψηλή φόρτιση.

Η αύξηση της τιμής του pH στα τυφλά των πτηνών που εκτρέφονται σε συνθήκες υψηλής φόρτισης ευνοεί την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό του *C. perfringens*, το οποίο επιβεβαιώνεται και από τον υψηλότερο πληθυσμό του *C. perfringens* στα τυφλά των πτηνών που εκτρέφονται σε υψηλή φόρτιση αλλά δεν μολύνθηκαν. Ωστόσο, στα πτηνά που μολύνθηκαν, ο πληθυσμός του *C. perfringens* στα τυφλά δεν διαφέρει σημαντικά, παρά τη διαφορετική φόρτιση δαπέδου. Η μόλυνση των πτηνών διατάραξε την ισορροπία στην οποία βρισκόταν οι διάφοροι κλώνοι *C. perfringens* της εντερικής μικροχλωρίδας μεταξύ τους, αλλά και με τα υπόλοιπα βακτήρια της μικροχλωρίδας (Nauerby και συν., 2003; Barbara και συν., 2008), με αποτέλεσμα να μετριάζεται η επίδραση της αυξημένης φόρτισης στον πληθυσμό του *C. perfringens* και στην τιμή του pH του περιεχομένου των τυφλών.

Οι μακροσκοπικές αλλοιώσεις του μώδους στομάχου έχουν συσχετιστεί με τον υψηλό πληθυσμό του *C. perfringens* στα τυφλά των κρεοπαραγωγών ορνιθίων (Novoa-Garrido και συν., 2006). Τα αποτελέσματα της δικής μας έρευνας συμφωνούν με τα ευρήματα των Novoa-Garrido και συν. (2006), επειδή η αύξηση της φόρτισης δαπέδου

προκάλεσε αύξηση του πληθυσμού του *C. perfringens* στα τυφλά καθώς επίσης και της συχνότητας εμφάνισης των μακροσκοπικών αλλοιώσεων του μύδους στομάχου.

Η μείωση της τιμής του ιξώδους του περιεχομένου της νήστιδας που παρατηρήθηκε μετά τη μικτή μόλυνση με *C. perfringens* και *Eimeria* spp. οφείλεται στις αλλοιώσεις NE και κοκκιδίωσης που προκάλεσε η μικτή μόλυνση (Waldenstedt και συν., 2000). Οι αλλοιώσεις που προκαλούνται στο γαστρεντερικό βλεννογόνο μεταβάλλουν τη σύσταση του εντερικού περιεχομένου, το οποίο γίνεται υδαρές ανάμικτο με αέρια και νεκρωτικό υλικό και προκαλούν ωσμωτικές και απορροφητικές μεταβολές, με αποτέλεσμα τη μείωση του ιξώδους (Crompton, 1976). Η περαιτέρω μείωση του ιξώδους που παρατηρήθηκε με το συνδυασμό της μόλυνσης και της αύξησης της φόρτισης οφείλεται πιθανόν στην αύξηση της σοβαρότητας των αλλοιώσεων NE και στη μεγαλύτερη κατανάλωση νερού από τα πτηνά (Feddes και συν., 2002).

Ανακεφαλαιωτικά, η αυξημένη φόρτιση δαπέδου αύξησε τη συχνότητα εμφάνισης και επιδείνωσε τη σοβαρότητα των αλλοιώσεων του ήπατος και της NE στο έντερο μετά από μικτή μόλυνση με *C. perfringens* και *Eimeria* spp., καθώς επίσης προκάλεσε αύξηση του πληθυσμού του *C. perfringens* και της τιμής του pH στα τυφλά. Η προδιάθεση στην εκδήλωση της NE που παρατηρείται στα κρεοπαραγωγά ορνίθια όταν εκτρέφονται σε συνθήκες αυξημένης φόρτισης ενισχύει την δυσμενή της δράση στην υγεία και την ευζωία των πτηνών, καθώς επίσης και τις οικονομικές της επιπτώσεις.

### **3.3 Πειραματισμός θερμικής καταπόνησης**

Η θερμική καταπόνηση προκάλεσε μείωση του ΣΒ τόσο στα πτηνά που μολύνθηκαν όσο και σε αυτά που δεν μολύνθηκαν. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με τα ευρήματα των Donkoh (1989) και Bartlett και Smith (2003). Η μείωση του ΣΒ που παρατηρήθηκε οφείλεται στην επιβράδυνση του μεταβολισμού (Yahav και Plavnik, 1999), στη μείωση της όρεξης (Hurwitz και συν., 1980) και στη μειωμένη κατανάλωσης τροφής από τα πτηνά (Yalcin και συν., 1997) τα οποία είχαν ως στόχο τον περιορισμό της παραγόμενης θερμότητας. Επίσης, στη μείωση του ΣΒ συμβάλλει και η κατανάλωση ενέργειας, από την ενεργοποίηση των θερμορρυθμιστικών μηχανισμών, για την αποβολή της παραγόμενης θερμότητας. Τα πτηνά σε καταστάσεις θερμικής καταπόνησης καταναλώνουν για την ανάπτυξη τους μόνο το 67% από την ενέργεια που προσλαμβάνουν μέσω της τροφής, ενώ το υπόλοιπο 33% αξιοποιείται για τη θερμορύθμιση.

Πολύ σημαντικό είναι το γεγονός ότι η θερμική καταπόνηση των πτηνών προκάλεσε την εκδήλωση αλλοιώσεων NE σε πτηνά που δεν είχαν μολυνθεί, ενώ σε πτηνά που μολύνθηκαν επιδείνωσε τη σοβαρότητα των αλλοιώσεων. Η προδιάθεση της θερμικής καταπόνησης στην εκδήλωση της NE μπορεί να ερμηνευτεί μέσω της επίδρασης που αυτή ασκεί στο ανοσοποιητικό σύστημα (Thaxton και συν., 1968).

Η έκθεση των πτηνών σε υψηλές θερμοκρασίες προκαλεί μείωση του μεγέθους του θυλάκου του Fabricious, του θύμου αδένου και του σπλήνα, τα οποία είναι όργανα που μετέχουν τόσο στην κυτταρική όσο και στη χυμική ανοσία (Bartlett και Smith, 2003). Συγκεκριμένα, η θερμική καταπόνηση προκαλεί μείωση του αριθμού των λευκοκυττάρων (Mashaly και συν., 2004), αναστολή της σύνθεσης Β και Τ λεμφοκυττάρων (Kadymov και Aleskerov, 1988), μείωση της φαγοκυτταρικής ικανότητας των λευκοκυττάρων (Kadymov και Aleskerov, 1988) και μείωση της παραγωγής αντισωμάτων (Zulkifi και συν., 2000). Στην πρόκληση της ανοσοκαταστολής συμβάλλει και η αύξηση της συγκέντρωσης κορτικοστερόνης του ορού του αίματος που προκαλεί η θερμική καταπόνηση (Ben Nathan και συν., 1976).

Στην προδιάθεση της NE, πιθανόν να συμβάλλει και η μεταβολή της σύνθεσης της εντερικής μικροχλωρίδας που παρατηρείται στα πτηνά τα οποία υφίστανται θερμική καταπόνηση (Suzuki και συν., 1983). Συγκεκριμένα, παρατηρείται αύξηση του πληθυσμού των σταφυλόκοκκων, των στρεπτόκοκκων και των κλωστρίδιων του γαστρεντερικού σωλήνα. Η φυσιολογική εντερική μικροχλωρίδα παρέχει προστασία στον ξενιστή από παθογόνα βακτήρια, εμποδίζοντας τον αποικισμό και τον πολλαπλασιασμό τους, μέσω του

ανταγωνιστικού αποκλεισμού (Nurmi και Randala, 1973). Η διαταραχή της δυναμικής ισορροπίας, στην οποία βρίσκεται η φυσιολογική εντερική μικροχλωρίδα, μειώνει την άμυνα του ξενιστή στις εντερικές μολύνσεις και δίνει τη ευκαιρία σε δυνητικά παθογόνα βακτήρια, όπως το *C. perfringens*, να προκαλέσουν νόσο (Burkholder και συν., 2008).

Σε καταστάσεις καταπόνησης, λόγω υψηλής θερμοκρασίας (Franco-Jimerez και Beck, 2007) ή/και της δράσης και άλλων παραγόντων καταπόνησης (Lindquist και Craig, 1988), παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών θερμικού σοκ. Οι πρωτεΐνες αυτές θα μπορούσαν να δράσουν ως επιφανειακοί επιθηλιακοί υποδοχείς, διευκολύνοντας τη σύνδεση των παθογόνων βακτηρίων, όπως του *C. perfringens* και της *S. enteritidis*, στο εντερικό επιθήλιο (Burkholder και συν., 2008).

Οι αιμοδυναμικές μεταβολές και ιδιαίτερα η περιφερική αγγειοδιαστολή που παρατηρείται κατά τη διάρκεια της θερμικής καταπόνησης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της κυκλοφορίας του αίματος στο γαστρεντερικό σωλήνα (Kregel και συν., 1988), η οποία οδηγεί στην υποξία των εντεροκυττάρων (Hall και συν., 1999) και στην κυτταρική δυσλειτουργία (Gisolfi, 2000). Η υποξία και η δυσλειτουργία των εντεροκυττάρων θα μπορούσε να μειώσει την ανθεκτικότητα του οργανισμού στις εντερικές μολύνσεις και να προδιαθέσει στην εκδήλωση της ΝΕ.

Η προστατευτική δράση της θερμικής καταπόνησης στην εκδήλωση μακροσκοπικών αλλοιώσεων στο μυώδη στόμαχο, όπως φαίνεται από τη μείωση της σοβαρότητας στα πτηνά της ομάδας όπου εφαρμόστηκε θερμική καταπόνηση συνοδεύτηκε από τη μείωση του πληθυσμού του *C. perfringens* στα τυφλά. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με τα ευρήματα των Novoa-Garrido και συν. (2006) οι οποίοι παρατήρησαν θετική συσχέτιση μεταξύ του πληθυσμού του *C. perfringens* στα τυφλά και των μακροσκοπικών αλλοιώσεων του μυώδους στομάχου. Η μείωση της συχνότητας εμφάνισης των μακροσκοπικών αλλοιώσεων και του πληθυσμού του *C. perfringens* στα τυφλά πιθανόν οφείλεται στη μείωση της κατανάλωσης τροφής και κατά συνέπεια και ιχθυαλεύρου, το οποίο ενοχοποιείται για την εμφάνιση των μακροσκοπικών αλλοιώσεων στο μυώδη στόμαχο (Tisljar και συν., 2002) και ευνοεί τον πολλαπλασιασμό του *C. perfringens* (Drew και συν., 2004).

Η θερμική καταπόνηση, παρά το γεγονός ότι προκαλεί σημαντικές μεταβολές στη μορφολογία του γαστρεντερικού σωλήνα και τη σύνθεση της μικροβιακής εντερικής χλωρίδας, δεν προκάλεσε σημαντικές μεταβολές του pH στο περιεχόμενο του γαστρεντερικού σωλήνα. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σύμφωνο με τα ευρήματα των Gordon και Ronald (1997). Η μείωση της τιμής του pH του εντερικού περιεχομένου, που παρατηρείται στις μολυσμένες ομάδες, οφείλεται στις αλλοιώσεις κοκκιδίωσης και ΝΕ που εκδηλώθηκαν, λόγω της μικτής

μόλυνσης που διενεργήθηκε για την πειραματική αναπαραγωγή της NE (Ruff και συν., 1974: Shane και συν., 1985). Η μείωση είναι εντονότερη στη νήστιδα και τον ειλέο, όπου αποτελούν τα κύρια σημεία εντόπισης των αλλοιώσεων NE (Al-Sheikhly και Truscott, 1977α).

Τα πτηνά τα οποία εκτίθενται σε υψηλές θερμοκρασίες μειώνουν την κατανάλωση τροφής για να περιορίσουν την παραγωγή θερμότητας και αυξάνουν την κατανάλωση νερού για να αυξήσουν την αποβολή θερμότητας μέσω εξάτμισης (Vo και συν., 1978: Yalcin και συν., 1997). Επίσης, η θερμική καταπόνηση αυξάνει το χρόνο διαβατότητας του εντερικού περιεχομένου κατά 20% (Gordon και Roland, 1998). Τόσο η μεταβολή στην κατανάλωση τροφής και νερού όσο και η μεταβολή του χρόνου διαβατότητας του εντερικού περιεχομένου επηρεάζουν σημαντικά τη διαμόρφωση της τιμής του ιξώδους του εντερικού περιεχομένου. Ωστόσο, στη δική μας έρευνα δεν παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση της θερμικής καταπόνησης στην τιμή του ιξώδους. Αυτό πιθανόν οφείλεται στο γεγονός ότι η θερμική καταπόνηση ήταν κυκλική και διαρκούσε 12 ώρες ημερησίως, επιτρέποντας στα πτηνά να διατρέφονται κανονικά στο διάστημα που η θερμοκρασία του θαλάμου ήταν φυσιολογική. Επίσης, το χρονικό διάστημα που μεσολάβησε από τη θερμική καταπόνηση και τη δειγματοληψία ήταν αρκετά μεγάλο, δίνοντας στα πτηνά τη δυνατότητα να εγκλιματιστούν στη φυσιολογική θερμοκρασία και να καταναλώσουν φυσιολογικές ποσότητες τροφής και νερού.

Η μείωση του ιξώδους του περιεχομένου της νήστιδας μετά τη μόλυνση με το *C. perfringens* και τη μικτή καλλιέργεια *Eimeria* spp. οφείλεται στις αλλοιώσεις κοκκιδίωσης και NE που προκάλεσε η μικτή μόλυνση (Waldenstedt και συν., 2000). Οι αλλοιώσεις NE και κοκκιδίωσης που προκλήθηκαν στο γαστρεντερικό βλεννογόνο είχαν ως αποτέλεσμα τη μεταβολή της σύστασης του εντερικού περιεχομένου και την πρόκληση ωσμωτικών και απορροφητικών μεταβολών, με συνέπεια τη μείωση του ιξώδους (Crompton, 1976).

Σύμφωνα με τους Kaldhusdal και συν. (1999), όταν ο πληθυσμός του *C. perfringens* ξεπερνά τις  $10^6$  cfu/g εντερικού περιεχομένου, υπάρχει αυξημένος κίνδυνος εκδήλωσης NE, ενώ σύμφωνα με τους Baba και συν. (1997), σε κλινικά περιστατικά NE, ο πληθυσμός του *C. perfringens* ανέρχεται έως τις  $10^8$  cfu/g εντερικού περιεχομένου. Ωστόσο, παρά το γεγονός ότι η θερμική καταπόνηση προκάλεσε την εκδήλωση της NE και επιδείνωσε τις αλλοιώσεις της, ο μέσος όρος του πληθυσμού του *C. perfringens* στα τυφλά των πτηνών που δεν μολύνθηκαν και εκτέθηκαν σε υψηλές θερμοκρασίες δεν ξεπέρασε τις  $10^6$  cfu/g εντερικού περιεχομένου. Αυτό οφείλεται στο γεγονός, ότι στον υπολογισμό του μέσου όρου του πληθυσμού του *C. perfringens* στα τυφλά συμπεριλαμβάνεται το σύνολο των πτηνών της



ομάδας. Ωστόσο, η πλειονότητα των πτηνών της ομάδας δεν εκδήλωσαν ΝΕ και είχαν φυσιολογικό πληθυσμό *C. perfringens* στα τυφλά, με αποτέλεσμα ο μέσος όρος να κυμαίνεται σε φυσιολογικά όρια.

Ανακεφαλαιωτικά, η θερμική καταπόνηση των πτηνών προκάλεσε την εκδήλωση μακροσκοπικών αλλοιώσεων ΝΕ σε πτηνά που δεν μολύνθηκαν και επιδείνωσε τη σοβαρότητα των αλλοιώσεων σε πτηνά που μολύνθηκαν, ενισχύοντας τη δράση της μόλυνσης. Η επίδραση της θερμικής καταπόνησης στην παθογένεια της ΝΕ πιθανόν οφείλεται στην ανοσοκαταστολή, τη μεταβολή της σύνθεσης της εντερικής μικροχλωρίδας, την αύξηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών θερμικού σοκ και στις αιμοδυναμικές μεταβολές που παρατηρούνται ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των θερμορυθμιστικών μηχανισμών.

### 3.4 Πειραματισμός καταπόνησης λόγω ψύχους

Το ψύχος αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους φυσικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες καταπόνησης των πτηνών. Η μείωση του ΣΒ που παρατηρήθηκε μετά την 20<sup>η</sup> ημέρα στα πτηνά των ομάδων όπου μειώθηκε η θερμοκρασία είναι σύμφωνη με τα ευρήματα της μελέτης των Hangalapura και συν. (2003). Η μείωση του ΣΒ οφείλεται στη διέγερση των θερμορρυθμιστικών μηχανισμών, η λειτουργία των οποίων απαιτεί την κατανάλωση ενέργειας για τη διατήρηση της θερμοκρασίας στα συγκεκριμένα επιθυμητά όρια, παρά τη χαμηλή θερμοκρασία περιβάλλοντος (Hangalapura, 2006).

Από τη μελέτη των αποτελεσμάτων της συχνότητας και του βαθμού αλλοιώσεων NE στο έντερο των πτηνών προέκυψε ότι η καταπόνηση των πτηνών λόγω ψύχους επηρεάζει την παθογένεια της NE, επιδεινώνοντας σημαντικά τη σοβαρότητα των αλλοιώσεων NE και αυξάνοντας σχετικά το ποσοστό των πτηνών που εκδηλώνουν αλλοιώσεις. Η συμβολή του ψύχους στην παθογένεια της NE ενισχύεται και από το γεγονός ότι προκαλεί αύξηση του πληθυσμού του *C. perfringens* στα τυφλά και της συχνότητας απομόνωσής του από το γαστρεντερικό σωλήνα και το ήπαρ των πτηνών.

Η επίδραση της καταπόνησης λόγω ψύχους στην παθογένεια της NE, πιθανόν, οφείλεται στην ανοσοκαταστολή που υφίστανται τα πτηνά, τα οποία εκτίθενται σε χαμηλές θερμοκρασίες (Hangalapura, 2006). Η επίδραση του ψύχους στο ανοσοποιητικό σύστημα επιτυγχάνεται είτε μέσω του βιοενεργειακού μηχανισμού είτε μέσω του ενδοκρινικού συστήματος (Hangalapura, 2006). Σύμφωνα με τους Hester και συν. (1996) και τον Gross και Siegel (1988), το ψύχος προκαλεί καταστολή της χυμικής ανοσολογικής αντίδρασης σε αβγοπαραγωγές όρνιθες που εκτρέφονται σε ατομικούς κλωβούς. Παρομοίως, η κυτταρική ανοσολογική αντίδραση αρσενικών ορνιθίων που εκτέθηκαν σε χαμηλή θερμοκρασία περιορίστηκε (Regnier και Kelley, 1981). Ωστόσο, σύμφωνα με τους Hangalapura και συν. (2006), η καταπόνηση των πτηνών λόγω ψύχους διεγείρει την κυτταρική ανοσία, αλλά όχι τη χυμική, παρά την αύξηση της συγκέντρωσης IL-12β και IL-4 που προκαλεί.

Η ανταπόκριση των πτηνών και ειδικότερα του ανοσοποιητικού συστήματος στο ψύχος και τη μόλυνση, επηρεάζεται άμεσα από τη διάρκεια της καταπόνησης και τη χρονική στιγμή που θα εφαρμοστεί η μόλυνση. Η συγκέντρωση κορτικοστερόνης στον ορό του αίματος των πτηνών, 6 ώρες μετά την έκθεση σε χαμηλές θερμοκρασίες, ήταν σημαντικά υψηλότερη, συγκριτικά με των πτηνών που δεν εκτέθηκαν. Ωστόσο, η συγκέντρωσή της, μετά από 24 ώρες, έφτασε στα ίδια επίπεδα με αυτά των πτηνών που δεν εκτέθηκαν (Shinder και συν., 2002).

Τα πτηνά προσαρμόζονται πολύ γρήγορα στις μεταβολές της θερμοκρασίας, με αποτέλεσμα, εάν η μόλυνση εφαρμοστεί πολύ αργότερα από τη μεταβολή της θερμοκρασίας, να μην επηρεαστεί από τις μεταβολές του ανοσοποιητικού συστήματος που προκαλεί η μεταβολή της θερμοκρασίας (Thaxton και Siegel, 1970). Σύμφωνα με τους Santin και συν. (2003), η έκθεση των πτηνών στο ψύχος δεν επηρέασε τη χυμική ανοσολογική αντίδραση, επειδή ο εμβολιασμός απείχε χρονικά από την καταπόνηση των πτηνών λόγω ψύχους ή εφαρμόστηκε μετά την προσαρμογή των πτηνών στις χαμηλές θερμοκρασίες. Στη δική μας έρευνα η μείωση της θερμοκρασίας του θαλάμου ήταν απότομη (μέσα σε 20 λεπτά) και η μόλυνση των πτηνών γινόταν ταυτόχρονα με την καταπόνηση λόγω ψύχους.

Η προδιάθεση του ψύχους στην παθογένεια της NE ενισχύει την άποψη ότι το νόσημα εκδηλώνεται συχνότερα τους ψυχρούς μήνες του έτους. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με επιδημιολογική έρευνα που διεξήχθη στη Νορβηγία (Kaldhusdal και Skjerve, 1996), το ποσοστό εμφάνισης της NE ήταν μεγαλύτερο την περίοδο Οκτώβριος – Μάρτιος. Ωστόσο, σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες που διεξήχθησαν στο ΗΒ (Hermans και Morgan, 2007), τον Καναδά (Long, 1973α: Bernier και συν., 1974) και τη Γερμανία (Koehler και συν., 1977), η συχνότητα εμφάνισης ήταν μεγαλύτερη τη θερμή περίοδο του έτους, Ιούλιος – Οκτώβριος. Η αντίθεση αυτή υποδηλώνει ότι η επίδραση της εποχής στην συχνότητα εμφάνισης της NE επηρεάζεται, εκτός από την θερμοκρασία και από άλλους παράγοντες, όπως διαχειριστικούς και διατροφικούς και καθιστά δύσκολη την απόδειξη της επίδρασης της θερμοκρασίας σε συνθήκες εκτροφής.

Η εμφάνιση των μακροσκοπικών αλλοιώσεων στο μύδι στομάχο σχετίζεται με τον πληθυσμό του *C. perfringens* στα τυφλά και όχι *per se* με τη NE (Novoa-Garrido και συν., 2006). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι στα πτηνά με NE, ο πληθυσμός του *C. perfringens* στα τυφλά είναι πολύ υψηλός με αποτέλεσμα μην μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα. Ωστόσο, στη δική μας έρευνα, η καταπόνηση των πτηνών λόγω ψύχους, παρόλο που αύξησε τον πληθυσμό του *C. perfringens* στα τυφλά, περιόρισε τη συχνότητα εμφάνισης και τη σοβαρότητα των μακροσκοπικών αλλοιώσεων στο μύδι στομάχο. Τα αντικρουόμενα αυτά αποτελέσματα πιθανόν να οφείλονται στη δράση άλλων παραγόντων που επίσης έχουν ενοχοποιηθεί για την πρόκληση αλλοιώσεων στο μύδι στομάχο (Ono και συν., 2001: Tisljar και συν., 2002: Hoerr, 2003).

Η καταπόνηση των πτηνών λόγω ψύχους επηρέασε σημαντικά το pH του εντερικού περιεχομένου. Συγκεκριμένα, προκάλεσε σημαντική αύξηση του pH στο περιεχόμενο του ειλεού και των τυφλών. Η μεταβολή αυτή ευνοεί τον πολλαπλασιασμό του *C. perfringens*, γεγονός που αποδεικνύεται από τον υψηλότερο πληθυσμό του στα τυφλά και τη μεγαλύτερη

συχνότητα απομόνωσής του από το γαστρεντερικό σωλήνα των πτηνών που εκτέθηκαν σε χαμηλές θερμοκρασίες (Mitsch και συν., 2004).

Η μείωση της τιμής του pH του εντερικού περιεχομένου που παρατηρείται στις μολυσμένες ομάδες οφείλεται στις αλλοιώσεις κοκκιδίωσης και NE που εκδηλώθηκαν, λόγω της μικτής μόλυνσης που διενεργήθηκε για την πειραματική αναπαραγωγή της NE (Ruff και συν., 1974; Shane και συν., 1985). Η μείωση είναι εντονότερη στη νήστιδα και τον ειλέο, όπου αποτελούν τα κύρια σημεία εντόπισης των αλλοιώσεων NE (Al-Sheikhly και Truscott, 1977α).

Η τιμή του ιξώδους στις μη μολυσμένες ομάδες ήταν σχετικά υψηλή, γεγονός που οφείλεται στην ιδιαίτερη σύνθεση του σιτηρεσίου, το οποίο περιείχε 43,65% σιτάρι και 7,5% σίκαλη. Τόσο το σιτάρι όσο και η σίκαλη είναι δημητριακοί καρποί πλούσιοι σε ΜΣΠ, οι οποίοι δεν διασπώνται από τα ένζυμα του πεπτικού συστήματος των πτηνών και προκαλούν αύξηση του ιξώδους (Riddell και Kong, 1992) και προδιάθεση στη NE (Bedford και Classen, 1992; Kaldhusdal και Hofshagen, 1992; Bedford, 2000). Ωστόσο, σύμφωνα με τους Waldenstedt και συν. (2000), η μείωση του ιξώδους του εντερικού περιεχομένου δεν είχε σημαντική επίδραση στη διαβάθμιση των αλλοιώσεων NE και τον πληθυσμό *C. perfringens* στα τυφλά.

Η μείωση του ιξώδους του περιεχομένου της νήστιδας, μετά τη μόλυνση με το *C. perfringens* και τη μικτή καλλιέργεια *Eimeria* spp., οφείλεται πιθανόν στις αλλοιώσεις κοκκιδίωσης που προκάλεσε η μικτή καλλιέργεια κοκκιδίων (Waldenstedt και συν., 2000). Οι αλλοιώσεις NE και κοκκιδίωσης που προκλήθηκαν στο γαστρεντερικό βλεννογόνο είχαν ως αποτέλεσμα τη μεταβολή της σύστασης του εντερικού περιεχομένου, το οποίο έγινε υδαρές, ανάμικτο με αέρια και νεκρωτικό υλικό και την πρόκληση ωσμωτικών και απορροφητικών μεταβολών, οδηγώντας στη μείωση του ιξώδους (Crompton, 1976).

Ανακεφαλαιωτικά, η καταπόνηση των πτηνών λόγω ψύχους επηρέασε σημαντικά την παθογένεια της NE, όπως φαίνεται από την επιδείνωση της σοβαρότητας των αλλοιώσεων της NE μετά από μικτή μόλυνση με *Eimeria* spp. και *C. perfringens* και την αύξηση του πληθυσμού του *C. perfringens* στα τυφλά. Ακόμη, προκάλεσε αύξηση της συχνότητας απομόνωσης του *C. perfringens* από το γαστρεντερικό σωλήνα και το ήπαρ. Η επίδραση της καταπόνησης των πτηνών λόγω ψύχους πιθανόν να εκδηλώνεται μέσω της μειωμένης ανοσολογικής ανταπόκρισης και της αύξησης του pH των τυφλών στα πτηνά που εκτίθενται σε χαμηλές θερμοκρασίες.

### **3.5 Πειραματισμός εμβολιασμού με ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο**

Η μικτή μόλυνση των πτηνών με *C. perfringens* και *E. maxima* ή δεκαπλάσια δόση ΕΛΔ αντικοκκιδιακού εμβολίου οδήγησε σε μείωση του ΣΒ. Το εύρημα αυτό είναι σύμφωνο με το αντίστοιχο της μελέτης των Jackson και συν. (2003). Η μείωση του ΣΒ οφείλεται στις αλλοιώσεις του γαστρεντερικού βλεννογόνου, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την κακή πέψη και την πλημμελή απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών του σιτηρεσίου (Ruff, 1978). Επίσης, σε καταστάσεις εντερίτιδας παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης κυτοκινών στον ορό του αίματος, λόγω της φλεγμονής του έντερου, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη όρεξη για κατανάλωση τροφής (Johnson, 1998).

Ο εμβολιασμός των πτηνών με το ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο, την 1<sup>η</sup> ημέρα της ζωής τους, οδήγησε σε μείωση του ΣΒ, η οποία ήταν εντονότερη με την πάροδο της ηλικίας και σύμφωνη με τη μείωση του ΣΒ των πτηνών που παρατηρήθηκε στις μελέτες των Danforth (1998) και Waldenstedt και συν. (1999). Ωστόσο, έρχεται σε αντίθεση με τα ευρήματα της μελέτης του Williams (1994), ο οποίος παρατήρησε καλύτερη ανάπτυξη των πτηνών που εμβολιάστηκαν, συγκριτικά με τους μάρτυρες, παρά το γεγονός ότι στο 4% των εμβολιασμένων πτηνών παρατηρήθηκαν αλλοιώσεις κοκκιδίωσης. Η διαφορά αυτή πιθανόν να οφείλεται στη χορήγηση ΑΑΠ σε όλες τις πειραματικές ομάδες και στο υψηλό ποσοστό θνητότητας (15,3 %) που παρατηρήθηκε στους μάρτυρες του πειράματος του Williams (1994). Επίσης, η δική μας έρευνα διήρκεσε μόνο 24 ημέρες με αποτέλεσμα τα πτηνά να μην εκδηλώσουν αντισταθμιστική ανάπτυξη.

Η εφαρμογή του αντικοκκιδιακού εμβολίου περιόρισε τόσο τη συχνότητα εμφάνισης όσο και τη σοβαρότητα των αλλοιώσεων ΝΕ, μετά από μικτή μόλυνση των πτηνών με *C. perfringens* και *E. maxima*. Η προστατευτική δράση του ΕΛΔ αντικοκκιδιακού εμβολίου είναι σύμφωνη με τους Williams και συν. (1999β), οι οποίοι ανέφεραν ότι κρεοπαραγωγά ορνίθια τα οποία, είχαν εμβολιαστεί με το πόσιμο νερό με ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο, δεν εκδήλωσαν ΝΕ, ενώ πτηνά στα οποία είχαν χορηγηθεί ιονοφόρα με ΑΑΠ εκδήλωσαν ΝΕ. Επίσης, σύμφωνα με τους McReynolds και συν. (2004), η χορήγηση ζωντανού αντικοκκιδιακού εμβολίου σε πολλαπλάσια δόση μείωσε τη θνητότητα της ΝΕ μετά από μόλυνση μόνο με *C. perfringens*, συγκριτικά με τα πτηνά τα οποία μολύνθηκαν με *C. perfringens* αλλά δεν εμβολιάστηκαν.

Ωστόσο, η προστατευτική δράση του ΕΛΔ αντικοκκιδιακού εμβολίου έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της κλινικής μελέτης των Ernik και Bednik (2001), οι οποίοι παρατήρησαν ότι στις εκτροφές όπου ο έλεγχος της κοκκιδίωσης βασιζόταν στην προληπτική

χορήγηση αντικοκκιδιακών φαρμάκων στο σιτηρέσιο, δεν εκδηλώθηκαν περιστατικά NE, παρά μόνο όταν αντικαταστάθηκαν από το ζωντανό αντικοκκιδιακό εμβόλιο.

Η αντίθεση των αποτελεσμάτων των Ernik και Bedrnik (2001) με τις παραπάνω μελέτες, αλλά και με της δικής μας έρευνας οφείλεται στο γεγονός ότι τα αποτελέσματα τους προέρχονται από κλινική μελέτη που διεξήχθη σε συνθήκες εκτροφής, όπου η μόλυνση των πτηνών δεν είναι ελεγχόμενη, ενώ οι διαχειριστικές πρακτικές, ο γενότυπος και το σιτηρέσιο των πτηνών, τα οποία έχουν άμεση επίδραση στην εκδήλωση της NE, μπορεί να είναι διαφορετικά.

Η προστατευτική δράση του ΕΛΔ αντικοκκιδιακού εμβολίου κατά της NE πιθανόν να οφείλεται στην πρόληψη της κοκκιδίωσης, η οποία αποτελεί το σημαντικότερο προδιαθεσικό παράγοντα της NE (Williams και συν., 2003). Ο περιορισμός των αλλοιώσεων της κοκκιδίωσης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των διαθέσιμων θρεπτικών συστατικών για το *C. perfringens* στον αυλό του γαστρεντερικού σωλήνα, περιορίζοντας με αυτόν τον τρόπο τον πολλαπλασιασμό και την τοξινογένεσή του. Ο περιορισμός των αλλοιώσεων της κοκκιδίωσης μειώνει και τον αποικισμό του *C. perfringens* στο γαστρεντερικό σωλήνα (Baba και συν., 1992).

Επίσης, η φλεγμονή που παρατηρείται τοπικά στο έντερο, ως αποτέλεσμα του πολλαπλασιασμού των εμβολιακών ωοκύστεων (Williams, 2002) διεγείρει, εκτός από τους μηχανισμούς της ειδικής ανοσίας και τους μηχανισμούς της μη ειδικής ανοσίας (Dalloul και Lillehoj, 2005). Συγκεκριμένα, από τους μηχανισμούς της μη ειδικής ανοσίας διεγείρονται τα φαγοκύτταρα, τα μακροφάγα και το συμπλήρωμα, ενώ από τους μηχανισμούς της ειδικής ανοσίας διεγείρονται η παραγωγή αντισωμάτων, η έκκριση κυτοκινών και τα λεμφοκύτταρα. Η διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος και ιδιαίτερα των μηχανισμών της μη ειδικής ανοσίας, που παρατηρείται έχει ως αποτέλεσμα την καλύτερη προετοιμασία και την αποτελεσματικότερη άμυνα του πτηνού για την αντιμετώπιση της ενδεχόμενης μόλυνσης από το *C. perfringens* και τον περιορισμό της εκδήλωσης της NE στα αρχικά στάδια (Dalloul και Lillehoj, 2005).

Η εμφάνιση των μακροσκοπικών αλλοιώσεων στο μυώδη στόμαχο των κρεοπαραγωγών ορνιθίων σχετίζεται με τον πληθυσμό του *C. perfringens* στα τυφλά (Novoa-Garrido και συν., 2006). Όσο υψηλότερος είναι ο πληθυσμός του στα τυφλά τόσο συχνότερες ή/και εντονότερες είναι οι μακροσκοπικές αλλοιώσεις στο μυώδη στόμαχο. Η εφαρμογή του εμβολίου στα πτηνά των ομάδων που δεν μολύνθηκαν οδήγησε σε μείωση της συχνότητας εμφάνισης και της σοβαρότητας των μακροσκοπικών αλλοιώσεων στο μυώδη στόμαχο και σε μείωση του πληθυσμού του *C. perfringens* στα τυφλά.

Αντίθετα, στα πτηνά που μολύνθηκαν με *C. perfringens* και *E. maxima*, ο εμβολιασμός προκάλεσε αύξηση της συχνότητας εμφάνισης και της σοβαρότητας των μακροσκοπικών αλλοιώσεων στο μυώδη στόμαχο και μείωση του πληθυσμού του *C. perfringens* στα τυφλά. Επίσης, η μικτή μόλυνση των πτηνών με *C. perfringens* και *E. maxima* που δεν είχαν εμβολιαστεί μείωσε τη συχνότητα εμφάνισης και τη σοβαρότητα των μακροσκοπικών αλλοιώσεων στο μυώδη στόμαχο, συγκριτικά με τη μόλυνση των πτηνών με *C. perfringens* και δεκαπλάσια δόση ΕΛΔ αντικοκκιδιακού εμβολίου, χωρίς ωστόσο να παρατηρείται ανάλογη μεταβολή του πληθυσμού του *C. perfringens* στα τυφλά. Από τα παραπάνω αποτελέσματα δεν προκύπτει συσχέτιση του πληθυσμού του *C. perfringens* στα τυφλά και των μακροσκοπικών αλλοιώσεων στο μυώδη στόμαχο, γεγονός το οποίο συμφωνεί με τα ευρήματα της μελέτης των Novoa-Garrido και συν. (2006), επειδή οι αλλοιώσεις του μυώδους στομάχου δεν σχετίζονται με τον πληθυσμό του *C. perfringens* στα τυφλά των πτηνών που εκδηλώνουν ΝΕ.

Η μείωση της συχνότητας εμφάνισης και της σοβαρότητας των μακροσκοπικών αλλοιώσεων στο μυώδη στόμαχο των πτηνών που δεν είχαν εμβολιαστεί, αλλά είχαν μολυνθεί με *C. perfringens* και *E. maxima*, πιθανόν οφείλεται στη μείωση της κατανάλωσης τροφής που προκάλεσαν οι σοβαρές αλλοιώσεις κοκκιδίωσης και ΝΕ (Reid και Pitois, 1965). Η μείωση της κατανάλωσης τροφής είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της κατανάλωσης ιχθυαλεύρου, το οποίο έχει ενοχοποιηθεί για την πρόκληση μακροσκοπικών αλλοιώσεων στο μυώδη στόμαχο (Tisljar και συν., 2002).

Ο εμβολιασμός των πτηνών με το ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο μείωσε τη συχνότητα απομόνωσης του *C. perfringens* στη νήστιδα και το ήπαρ, μετά από τη μικτή μόλυνση με *C. perfringens* και *E. maxima*. Η μείωση αυτή πιθανόν οφείλεται στον περιορισμό των αλλοιώσεων της *E. maxima* στη νήστιδα, η οποία αποτελεί και το σημείο εντόπισής της, με αποτέλεσμα να περιορίζεται και ο αποικισμός του *C. perfringens* στο σημείο αυτό (Long και Reid, 1982). Οι αλλοιώσεις στο γαστρεντερικό βλεννογόνο προκαλούν τη διάσπαση του εντερικού βλεννογόνιου φραγμού και επιτρέπουν σε μικροοργανισμούς που αποικούν στο έντερο να εισέλθουν στην κυκλοφορία του αίματος και να εγκατασταθούν στο ήπαρ, μέσω της πυλαίας κυκλοφορίας (Lovland και Kaldhusdal, 1999). Η μείωση της συχνότητας απομόνωσης του *C. perfringens* από το ήπαρ οφείλεται στις ηπιότερες αλλοιώσεις κοκκιδίωσης και ΝΕ που παρατηρήθηκαν μετά τον εμβολιασμό των πτηνών.

Η μόλυνση των πτηνών είτε με *C. perfringens* και *E. maxima* είτε με *C. perfringens* και δεκαπλάσια δόση ΕΛΔ αντικοκκιδιακού εμβολίου μείωσε σημαντικά την τιμή του pH του περιεχομένου της νήστιδας και του ειλεού, συγκριτικά με τα πτηνά τα οποία δεν μολύνθηκαν.

Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι στο πειραματικό μοντέλο αναπαραγωγής της ΝΕ χρησιμοποιήθηκε μικτή μόλυνση με *C. perfringens* και *Eimeria* spp., με αποτέλεσμα την ταυτόχρονη εκδήλωση αλλοιώσεων ΝΕ και κοκκιδίωσης και τη μείωση της τιμής του pH (Ruff και συν., 1974; Shane και συν., 1985).

Η μικτή μόλυνση των πτηνών με *C. perfringens* και *E. maxima* οδήγησε στην εντονότερη μείωση του pH του περιεχομένου του δωδεκαδακτύλου, της νήστιδας και του ειλεού, συγκριτικά με τη μόλυνση των πτηνών με *C. perfringens* και δεκαπλάσια δόση ΕΛΔ αντικοκκιδιακού εμβολίου, υποδηλώνοντας ότι οι αλλοιώσεις κοκκιδίωσης ήταν εντονότερες. Αυτό επιβεβαιώνεται και από το γεγονός ότι ο εμβολιασμός των πτηνών με ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο περιόρισε σημαντικά την πτώση του pH του περιεχομένου του δωδεκαδακτύλου, της νήστιδας και του ειλεού, μετά από μικτή μόλυνση των πτηνών με *C. perfringens* και *E. maxima*. Οι εντονότερες αλλοιώσεις κοκκιδίωσης, μετά από μικτή μόλυνση των πτηνών με *C. perfringens* και *E. maxima*, συγκριτικά με τη μόλυνση των πτηνών με *C. perfringens* και δεκαπλάσια δόση ΕΛΔ αντικοκκιδιακού εμβολίου, πιθανόν οφείλονται στο γεγονός ότι οι ωοκύστες της *E. maxima* είναι πλήρους λοιμογόνου δύναμης, ενώ αντίθετα οι εμβολιακές ωοκύστες έχουν υποστεί μείωση της λοιμογόνου δύναμης.

Η αύξηση του ιξώδους του εντερικού περιεχομένου προκαλεί διαταραχές στην πέψη και απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών, με αποτέλεσμα την καθυστέρηση στην ανάπτυξη (Bedford και Classen, 1992). Η αύξηση του ιξώδους του περιεχομένου του ειλεού στα πτηνά που εμβολιάστηκαν συμφωνεί με τα ευρήματα των Bedford και Classen (1992), επειδή συνοδεύτηκε από καθυστέρηση στην ανάπτυξη. Ωστόσο, έρχεται σε αντίθεση με τα ευρήματα των Waldenstedt και συν. (2000), σύμφωνα με τα οποία η κοκκιδίωση προκαλεί μείωση του ιξώδους. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι εμβολιακές ωοκύστες είναι ζωντανές, αλλά η λοιμογόνος δύναμή τους έχει περιοριστεί, με αποτέλεσμα να μην μπορούν να εκδηλώσουν δράση ανάλογη των φυσικών ωοκύστεων. Επίσης, ο αριθμός των εμβολιακών ωοκύστεων είναι μικρότερος, συγκριτικά με τον αριθμό στις πειραματικές και τις φυσικές μολύνσεις.

Αντίθετα, στα πτηνά που μολύνθηκαν με *C. perfringens* και *E. maxima* η μείωση του ιξώδους του περιεχομένου της νήστιδας και του ειλεού είναι εντονότερη από ότι στα πτηνά που μολύνθηκαν με *C. perfringens* και δεκαπλάσια δόση ΕΛΔ αντικοκκιδιακού εμβολίου. Αυτό οφείλεται στις εντονότερες αλλοιώσεις κοκκιδίωσης που συνυπάρχουν, λόγω της μόλυνσης με μεγάλο αριθμό ωοκύστεων *E. maxima* πλήρους λοιμογόνου δύναμης και επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι ο εμβολιασμός περιορίζει τη μείωση του ιξώδους. Η



μείωση του ιξώδους είναι αποτέλεσμα ωσμωτικών και απορροφητικών μεταβολών, λόγω των αλλοιώσεων του γαστρεντερικού βλεννογόνου (Crompton, 1976).

Ο εμβολιασμός των πτηνών με το ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο μείωσε τον πληθυσμό του *C. perfringens* στα τυφλά των πτηνών, τόσο αυτών που μολύνθηκαν όσο και αυτών που δεν μολύνθηκαν, συγκριτικά με τους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες, αντίστοιχα. Η μείωση αυτή είναι συμβατή με την προστατευτική δράση του αντικοκκιδιακού εμβολίου κατά της ΝΕ, ωστόσο έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της μελέτης των Waldenstedt και συν. (1999), οι οποίοι παρατήρησαν αύξηση του πληθυσμού του *C. perfringens* στα τυφλά, συγκριτικά με τους μάρτυρες. Η διαφορά αυτή πιθανόν οφείλεται στην προσθήκη αντικοκκιδιακών φαρμάκων στο σιτηρέσιο των μαρτύρων της έρευνας των Waldenstedt και συν. (1999), τα οποία λόγω της ταυτόχρονης αντικλωστριδιακής τους δράσης περιόρισαν τον πληθυσμό του *C. perfringens*.

Για την πειραματική αναπαραγωγή της ΝΕ δεν αρκεί μόνο η μόλυνση με *C. perfringens*, αλλά απαιτείται η προηγούμενη δράση παραγόντων που προδιαθέτουν στην εκδήλωσή της, έτσι ώστε να διαμορφωθούν κατάλληλα οι συνθήκες στο γαστρεντερικό σωλήνα για τον πολλαπλασιασμό και την τοξιγένεση του *C. perfringens*. Ένας από τους σημαντικότερους προδιαθεσικούς παράγοντες της ΝΕ είναι ο προηγούμενος τραυματισμός του γαστρεντερικού βλεννογόνου από *Eimeria* spp. (Al-Sheikly και Al-Saieg, 1980). Για αυτόν το λόγο, στα περισσότερα πειραματικά μοντέλα αναπαραγωγής της ΝΕ χρησιμοποιείται μικτή μόλυνση *C. perfringens* και *E. maxima* (Williams και συν., 2003) ή πολλαπλάσια δόση ΕΛΔ αντικοκκιδιακού εμβολίου (Keyburn και συν., 2006: Gholamiandekhordeh και συν., 2007: Pedersen και συν., 2008).

Στη δική μας έρευνα τόσο η μικτή μόλυνση των πτηνών με *C. perfringens* και *E. maxima* όσο και η μικτή μόλυνση με *C. perfringens* και δεκαπλάσια δόση ΕΛΔ αντικοκκιδιακού εμβολίου προκάλεσαν την εκδήλωση αλλοιώσεων ΝΕ, υποδηλώνοντας την επιτυχία του πειραματικού μοντέλου αναπαραγωγής της.

Συγκριτικά, η μικτή μόλυνση των πτηνών με *C. perfringens* και *E. maxima* αύξησε το ποσοστό των πτηνών που έφεραν αλλοιώσεις ΝΕ. Η αύξηση της συχνότητας εμφάνισης της ΝΕ αποτελεί ένα πολύ χρήσιμο χαρακτηριστικό του πειραματικού μοντέλου που χρησιμοποιείται για την αναπαραγωγή της, το οποίο συμβάλλει στην καλύτερη μελέτη και κατανόηση της παθογένειας της ΝΕ, αλλά και στον έλεγχο της αποτελεσματικότητας των προϊόντων που στοχεύουν στην πρόληψη αυτής. Επίσης, η μόλυνση μόνο με ένα είδος κοκκιδίου περιορίζει σημαντικά τη διακύμανση των αποτελεσμάτων μέσα στην ομάδα, συγκριτικά με τη μόλυνση με 4 ή και περισσότερα είδη κοκκιδίων που περιέχονται στα

ζωντανά αντικοκκιδιακά εμβόλια, επιτρέποντας την ευκολότερη και ασφαλέστερη εξαγωγή συμπερασμάτων.

Από την άλλη πλευρά όμως, η αύξηση της σοβαρότητας των αλλοιώσεων της ΝΕ που προκάλεσε η μικτή μόλυνση των πτηνών με *C. perfringens* και *E. maxima*, συγκριτικά με τη μικτή μόλυνση με *C. perfringens* και δεκαπλάσια δόση ΕΛΔ αντικοκκιδιακού εμβολίου, επηρεάζει σημαντικά την ιστοπαθολογική εικόνα των αλλοιώσεων και τους δείκτες της ανοσολογικής διέγερσης των πτηνών, με αποτέλεσμα να είναι δύσκολη η διάκριση μεταξύ αυτών που οφείλονται στη ΝΕ και αυτών που οφείλονται στην κοκκιδίωση (Gholamiandekhordi και συν., 2007).

Ωστόσο, επειδή και στα δύο πειραματικά μοντέλα το ποσοστό των πτηνών με αλλοιώσεις ΝΕ είναι υψηλό, χωρίς να παρατηρείται αύξηση του ποσοστού θνητότητας, θα μπορούσαν και τα δύο να χρησιμοποιηθούν με επιτυχία για την πειραματική αναπαραγωγή του νοσήματος. Συγκεκριμένα, το πειραματικό μοντέλο της μικτής μόλυνσης με *C. perfringens* και *E. maxima* θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας εμβολίων και προϊόντων με θεραπευτική δράση κατά της ΝΕ, ενώ το πειραματικό μοντέλο με τη μικτή μόλυνση με *C. perfringens* και δεκαπλάσια δόση ΕΛΔ αντικοκκιδιακού εμβολίου θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας προϊόντων με προληπτική δράση κατά της ΝΕ, καθώς επίσης για τη μελέτη και κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στην παθογένεια και την ανοσία της ΝΕ.

Ανακεφαλαιωτικά, ο εμβολιασμός των πτηνών με ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο περιορίζει τη συχνότητα εμφάνισης και τη σοβαρότητα των αλλοιώσεων ΝΕ, μετά από μικτή μόλυνση με *C. perfringens* και *E. maxima*. Η προστατευτική δράση του εμβολίου ενισχύεται και από τη μικρότερη συχνότητα απομόνωσης του *C. perfringens* από τη νήστιδα και το ήπαρ και από το μικρότερο πληθυσμό *C. perfringens* που παρατηρείται στα τυφλά των πτηνών που εμβολιάστηκαν. Η ιδιότητα αυτή του εμβολίου, το καθιστά ακόμη πιο σημαντικό εργαλείο στην πρόληψη της κοκκιδίωσης αλλά και της ΝΕ, δύο νοσημάτων με ιδιαίτερα σημαντικές επιπτώσεις για την πτηνοτροφία.



#### **4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

**Συμπεράσματα πειραματισμού για την εκτίμηση του φυσικού περιορισμού της διατροφής στην παθογένεια της NE στα κρεοπαραγωγά ορνίθια.**

*Ο φυσικός περιορισμός της διατροφής:*

- Υποβάθμισε σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) τη σοβαρότητα και τη συχνότητα εμφάνισης των μακροσκοπικών αλλοιώσεων του ήπατος.
- Μείωσε σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) την τιμή του pH του περιεχομένου της νήστιδας και του ειλεού, την τιμή του ιξώδους του περιεχομένου της νήστιδας και τον πληθυσμό του *C. perfringens* στα τυφλά.
- Εκδήλωσε προστατευτική δράση κατά της NE, μειώνοντας σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) τη σοβαρότητα και σχετικά ( $P > 0.10$ ) τη συχνότητα εμφάνισης αλλοιώσεων NE, αντίστοιχα.

**Συμπεράσματα πειραματισμού για την εκτίμηση της αυξημένης φόρτισης δαπέδου στην παθογένεια της NE στα κρεοπαραγωγά ορνίθια.**

*Η αυξημένη φόρτιση δαπέδου:*

- Επιδείνωσε σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) τη σοβαρότητα και τη συχνότητα εμφάνισης των μακροσκοπικών αλλοιώσεων του ήπατος, καθώς και τη συχνότητα εμφάνισης των μακροσκοπικών αλλοιώσεων του μυώδους στομάχου.
- Προκάλεσε σημαντική ( $P \leq 0.05$ ) μείωση της τιμής του pH του περιεχομένου του δωδεκαδακτύλου και σημαντική ( $P \leq 0.05$ ) αύξηση των τυφλών.
- Αύξησε σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) τη συχνότητα απομόνωσης του *C. perfringens* από το δωδεκαδάκτυλο, τη νήστιδα και το ήπαρ και τον πληθυσμό του *C. perfringens* στα τυφλά.
- Επηρέασε την παθογένεια της NE, προκαλώντας σημαντική ( $P \leq 0.05$ ) αύξηση της σοβαρότητας και συχνότητας εμφάνισης των αλλοιώσεων NE.

**Συμπεράσματα πειραματισμού για την εκτίμηση της θερμικής καταπόνησης στην παθογένεια της NE στα κρεοπαραγωγά ορνίθια.**

*Η θερμική καταπόνηση των πτηνών:*

- Υποβάθμισε σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) τη σοβαρότητα των μακροσκοπικών αλλοιώσεων του μυώδους στομάχου.

- Μείωσε σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) την τιμή του pH του περιεχομένου του δωδεκαδακτύλου.
- Προκάλεσε την εκδήλωση αλλοιώσεων NE σε πτηνά που δεν μολύνθηκαν.
- Αύξησε σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) τη σοβαρότητα των αλλοιώσεων NE στα πτηνά που μολύνθηκαν.

### **Συμπεράσματα πειραματισμού για την εκτίμηση της καταπόνησης λόγω ψύχους στην παθογένεια της NE στα κρεοπαραγωγά ορνίθια.**

*Η καταπόνηση των πτηνών λόγω ψύχους:*

- Περιορίσε σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) τη συχνότητα και τη σοβαρότητα εμφάνισης μακροσκοπικών αλλοιώσεων στο μυώδη στόμαχο.
- Μείωσε σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) την τιμή του ιξώδους του περιεχομένου της νήστιδας και αύξησε σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) την τιμή του pH του περιεχομένου των τυφλών.
- Αύξησε σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) τη συχνότητα απομόνωσης του *C. perfringens* από το γαστρεντερικό σωλήνα και το ήπαρ, καθώς και τον πληθυσμό του στα τυφλά.
- Επηρέασε την παθογένεια της NE, προκαλώντας σημαντική ( $P \leq 0.05$ ) αύξηση της σοβαρότητας των αλλοιώσεων NE.

### **Συμπεράσματα πειραματισμού για την εκτίμηση του εμβολιασμού με ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο στην παθογένεια της NE στα κρεοπαραγωγά ορνίθια.**

*Ο εμβολιασμός των πτηνών με ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο:*

- Περιορίσε σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) τη συχνότητα εμφάνισης μακροσκοπικών αλλοιώσεων στο ήπαρ και τον μυώδη στόμαχο.
- Προκάλεσε σημαντική ( $P \leq 0.05$ ) αύξηση της τιμής του pH του περιεχομένου του ειλεού και της τιμής του ιξώδους του περιεχομένου του ειλεού, καθώς επίσης σημαντική ( $P \leq 0.05$ ) μείωση της τιμής του pH του περιεχομένου του δωδεκαδακτύλου.
- Αύξησε σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) τη συχνότητα απομόνωσης του *C. perfringens* από τη νήστιδα και τον πληθυσμό του *C. perfringens* στα τυφλά.

*Η μόλυνση των πτηνών με *C. perfringens* και *E. maxima*, συγκριτικά με τη μόλυνση με *C. perfringens* και δεκαπλάσια δόση ΕΛΔ αντικοκκιδιακού εμβολίου:*

- Επιδείνωσε σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) τη σοβαρότητα και τη συχνότητα εμφάνισης των μακροσκοπικών αλλοιώσεων στο ήπαρ και περιορίσε σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) τη συχνότητα εμφάνισης μακροσκοπικών αλλοιώσεων στο μυώδη στόμαχο.

- Μείωσε σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) την τιμή του pH του περιεχομένου του δωδεκαδακτύλου, της νήστιδας και του ειλεού και την τιμή του ιξώδους του περιεχομένου της νήστιδας και του ειλεού.
- Αύξησε σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) τη συχνότητα απομόνωσης του *C. perfringens* από το ήπαρ, το μυώδη στόμαχο και το δωδεκαδάκτυλο.
- Προκάλεσε σημαντική ( $P \leq 0.05$ ) αύξηση της συχνότητας εμφάνισης και της σοβαρότητας των αλλοιώσεων NE.

*Ο εμβολιασμός των πτηνών με ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο πριν τη μόλυνση με C. perfringens και E. maxima:*

- Περιορίσε σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) τη συχνότητα εμφάνισης μακροσκοπικών αλλοιώσεων στο ήπαρ και αύξησε σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) τη συχνότητα εμφάνισης μακροσκοπικών αλλοιώσεων στο μυώδη στόμαχο.
- Περιορίσε σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) τη μείωση της τιμής του pH του περιεχομένου του δωδεκαδακτύλου, της νήστιδας και του ειλεού, καθώς επίσης και τη μείωση της τιμής του ιξώδους του περιεχομένου της νήστιδας.
- Περιορίσε σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) τη συχνότητα απομόνωσης του *C. perfringens* από τη νήστιδα και το ήπαρ και την αύξηση του πληθυσμού του στα τυφλά.
- Επηρέασε την παθογένεια της NE, περιορίζοντας σημαντικά ( $P \leq 0.05$ ) τη σοβαρότητα και τη συχνότητα εμφάνισης των αλλοιώσεων NE.



## **5. ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ**

Ο περιορισμός της διατροφής αποτελεί στρατηγική διαχείρισης της διατροφής και του ρυθμού ανάπτυξης των πτηνών με αρκετές εφαρμογές στην συστηματική πτηνοτροφία. Η προστατευτική επίδραση του φυσικού περιορισμού της διατροφής, κατά της NE, στα κρεοπαραγωγά ορνίθια αυξάνει ακόμη περισσότερο τις πρακτικές του εφαρμογές. Θα μπορούσε να εφαρμόζεται συμπληρωματικά της αντιβιοτικής θεραπείας με το πόσιμο νερό, αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα της θεραπείας και περιορίζοντας ταυτόχρονα το κόστος του νοσήματος. Επίσης, θα μπορούσε να εκτιμηθεί η επίδραση του φυσικού περιορισμού διατροφής και σε άλλες παθολογικές καταστάσεις του πεπτικού συστήματος ή και άλλων συστημάτων στα κρεοπαραγωγά ορνίθια. Τέλος, ο φυσικός περιορισμός της διατροφής χρησιμοποιείται σε διάφορα πειραματικά μοντέλα αναπαραγωγής της NE πριν τη μόλυνση, μειώνοντας πιθανόν την αποτελεσματικότητά τους και θα πρέπει να αποφεύγεται.

Η φόρτιση δαπέδου της εκτροφής έχει ιδιαίτερη σημασία για την εξέλιξη και την πρόοδο της συστηματικής πτηνοτροφίας, επειδή επηρεάζει σημαντικά τα έσοδα του πτηνοτρόφου, καθώς επίσης την υγεία και την ευζωία των πτηνών. Η επίδραση της αυξημένης φόρτισης δαπέδου στην παθογένεια της NE ενισχύει ακόμη περισσότερο το ρόλο της στη διαχείριση των πτηνοτροφικών εκμεταλλεύσεων και θα πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη στα προγράμματα ελέγχου και πρόληψης της NE. Επίσης, θα μπορούσε να εκτιμηθεί η επίδραση της αυξημένης φόρτισης δαπέδου και σε άλλες παθολογικές καταστάσεις του πεπτικού συστήματος ή και άλλων συστημάτων. Τέλος, η αυξημένη φόρτιση θα μπορούσε να ενσωματωθεί στα πειραματικά μοντέλα αναπαραγωγής της NE, με στόχο την αύξηση της συχνότητας εμφάνισης της NE και τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας του πειραματικού μοντέλου.

Οι επιπτώσεις της θερμικής καταπόνησης για την πτηνοτροφία οφείλονται κυρίως στην υψηλή θνητότητα και την αρνητική επίδραση που ασκεί στις αποδόσεις των πτηνών και ενισχύονται από την επίδρασή τους στην παθογένεια της NE. Η θερμική καταπόνηση θα μπορούσε να ενσωματωθεί στα πειραματικά μοντέλα αναπαραγωγής της NE, με στόχο την αύξηση της συχνότητας εμφάνισης της NE και τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας του πειραματικού μοντέλου. Ωστόσο, η πειραματική της εφαρμογή προϋποθέτει την αγορά ειδικού μηχανολογικού εξοπλισμού τόσο για την αύξηση της θερμοκρασίας όσο και για τον έλεγχο αυτής, το κόστος του οποίου πολλές φορές είναι απαγορευτικό. Μελλοντικά, θα μπορούσε να εκτιμηθεί η επίδραση της θερμικής καταπόνησης των πτηνών και σε άλλες



παθολογικές καταστάσεις του πεπτικού και του αναπνευστικού συστήματος ή και άλλων συστημάτων.

Το ψύχος είναι ο σημαντικότερος από όλους τους φυσικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες καταπόνησης, οι οποίοι επηρεάζουν την υγεία και την ευζωία των πτηνών. Η ιδιαίτερη σημασία της καταπόνησης των πτηνών λόγω ψύχους ενισχύεται και από την επίδραση που ασκεί στην παθογένεια της NE. Η αύξηση της συχνότητας εμφάνισης της NE και η επιδείνωση των αλλοιώσεών της, μετά την καταπόνηση των πτηνών λόγω ψύχους, αποτελούν ιδιαίτερα χρήσιμα χαρακτηριστικά του πειραματικού μοντέλου που χρησιμοποιείται για την αναπαραγωγή της και θα μπορούσε να ενσωματωθεί στα πειραματικά μοντέλα. Ωστόσο, η πειραματική της εφαρμογή προϋποθέτει την αγορά ειδικού μηχανολογικού εξοπλισμού, τόσο για τη μείωση της θερμοκρασίας όσο και για τον έλεγχο αυτής, το κόστος του οποίου πολλές φορές είναι απαγορευτικό. Για αυτόν το λόγο, η διενέργεια των πειραματισμών θα μπορούσε να προγραμματιστεί την ψυχρή περίοδο του έτους, με στόχο την εκμετάλλευση του συστήματος εξαιρετισμού και της χαμηλής θερμοκρασίας περιβάλλοντος. Επιπρόσθετα, λόγω της έντονης επίδρασης της καταπόνησης των πτηνών λόγω ψύχους στην παθογένεια της NE, θα ήταν χρήσιμο να εκτιμηθεί η επίδραση της καταπόνησης των πτηνών λόγω ψύχους και σε άλλα νοσήματα που εντοπίζονται στο πεπτικό, το αναπνευστικό ή/και το ανοσοποιητικό σύστημα.

Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα αντιοκκιδιακά φάρμακα, τα υψηλό κόστος παρασκευής νέων φαρμάκων και η πίεση των καταναλωτικών οργάνωσεων για την παραγωγή βιολογικών κτηνοτροφικών προϊόντων αυξάνουν τη συχνότητα εφαρμογής του αντιοκκιδιακού εμβολιασμού ως μέτρο πρόληψης της κοκκιδίωσης και ενισχύουν τη σπουδαιότητά του για την πτηνοτροφία. Η προστατευτική δράση του ΕΛΔ αντιοκκιδιακού εμβολίου έναντι της κοκκιδίωσης κατά κύριο λόγο, αλλά και της NE σε μικρότερο βαθμό, το καθιστά ακόμη πιο σημαντικό εργαλείο στην πρόληψη των δύο νοσημάτων. Τα νοσήματα αυτά, έχουν σημαντικές επιπτώσεις για την παγκόσμια συστηματική πτηνοτροφία και αθροιστικά ευθύνονται για τη μεγαλύτερη απώλεια κερδών για τους πτηνοτρόφους. Μελλοντικά θα μπορούσε να εκτιμηθεί η επίδραση του εμβολιασμού με ΕΛΔ αντιοκκιδιακό εμβόλιο στη μόλυνση των πτηνών και με άλλους λοιμογόνους παράγοντες που προσβάλλουν τον πεπτικό σύστημα, καθώς επίσης και η επίδραση των προσθετικών διατροφής, που χρησιμοποιούνται για την πρόληψη της NE, στην αποτελεσματικότητα του εμβολιασμού με ΕΛΔ αντιοκκιδιακό εμβόλιο.

Τόσο η μικτή μόλυνση των πτηνών με *C. perfringens* και *E. maxima* όσο και η μικτή μόλυνση με *C. perfringens* και δεκαπλάσια δόση ΕΛΔ αντιοκκιδιακού εμβολίου

προκάλεσαν την εκδήλωση αλλοιώσεων NE, υποδηλώνοντας την επιτυχία του πειραματικού μοντέλου αναπαραγωγής της. Ωστόσο, συγκριτικά, η μικτή μόλυνση των πτηνών με *C. perfringens* και *E. maxima* αύξησε τη σοβαρότητα και τη συχνότητα εμφάνισης των αλλοιώσεων NE.

Η αύξηση της συχνότητας εμφάνισης της NE αποτελεί ένα πολύ χρήσιμο χαρακτηριστικό του πειραματικού μοντέλου που χρησιμοποιείται για την αναπαραγωγή της, το οποίο συμβάλλει στην καλύτερη μελέτη και κατανόηση της παθογένειας της NE, αλλά και στον έλεγχο της αποτελεσματικότητας των προϊόντων που στοχεύουν στην πρόληψή της. Επίσης, η μόλυνση μόνο με ένα είδος κοκκιδίου περιορίζει σημαντικά τη διακύμανση των αποτελεσμάτων μέσα στην ομάδα, συγκριτικά με τη μόλυνση με 4 ή και περισσότερα είδη κοκκιδίων που περιέχονται στα ζωντανά αντικοκκιδιακά εμβόλια, επιτρέποντας την ευκολότερη και ασφαλέστερη εξαγωγή συμπερασμάτων και περιορίζοντας τον αριθμό των απαιτούμενων πειραματόζωων.

Από την άλλη πλευρά όμως, η αύξηση της σοβαρότητας των αλλοιώσεων της NE που προκάλεσε η μικτή μόλυνση των πτηνών με *C. perfringens* και *E. maxima*, συγκριτικά με τη μικτή μόλυνση με *C. perfringens* και δεκαπλάσια δόση ΕΛΔ αντικοκκιδιακού εμβολίου, επηρεάζει σημαντικά την ιστοπαθολογική εικόνα των αλλοιώσεων και τους δείκτες της ανοσολογικής διέγερσης των πτηνών, με αποτέλεσμα να είναι δύσκολη η διάκριση μεταξύ αυτών που οφείλονται στη NE και αυτών που οφείλονται στην κοκκιδίωση.

Ωστόσο, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν και τα δύο πειραματικά μοντέλα με επιτυχία για την πειραματική αναπαραγωγή του νοσήματος, επειδή και στα δύο το ποσοστό των πτηνών με αλλοιώσεις NE είναι υψηλό, χωρίς να παρατηρείται αύξηση του ποσοστού θνητότητας. Συγκεκριμένα, το πειραματικό μοντέλο της μικτής μόλυνσης με *C. perfringens* και *E. maxima* θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας εμβολίων και προϊόντων με θεραπευτική δράση κατά της NE, ενώ το πειραματικό μοντέλο με τη μικτή μόλυνση με *C. perfringens* και δεκαπλάσια δόση ΕΛΔ αντικοκκιδιακού εμβολίου θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας προϊόντων με προληπτική δράση κατά της NE, καθώς επίσης για τη μελέτη και κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στην παθογένεια και την ανοσία της NE.

Πειραματικά μοντέλα με ομοιομορφία σε όλες τις επιμέρους παραμέτρους, θα επιτρέψουν περαιτέρω πρόοδο στην ανάπτυξη και την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας νέων μεθόδων για τον καλύτερο έλεγχο της NE στα ορνίθια.



## **6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Η νεκρωτική εντερίτιδα αποτελεί ένα νόσημα με σημαντικές οικονομικές επιπτώσεις, το οποίο εκτός από την επίδραση στην υγεία και την ευζωία των πτηνών αποτελεί κίνδυνο και για τη δημόσια υγεία. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα κάθε παράγοντας που επηρεάζει την εκδήλωσή της NE να αποκτά ιδιαίτερη σημασία. Η επίδραση των παραγόντων καταπόνησης, όπως του φυσικού περιορισμού της διατροφής, της αυξημένης φόρτισης δαπέδου, της θερμικής καταπόνησης, της καταπόνησης λόγω ψύχους και του εμβολιασμού με ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο στην παθογένεια της NE δεν έχει διερευνηθεί.

Κίνητρο της δικής μας πειραματικής έρευνας αποτέλεσε αφενός η απουσία αναφορών στη διεθνή βιβλιογραφία για την επίδραση των παραγόντων καταπόνησης στην παθογένεια της NE και αφετέρου η υψηλή συχνότητα εφαρμογής των διαχειριστικών παραγόντων στη συστηματική πτηνοτροφία. Επίσης, κίνητρο για τη διενέργεια της δικής μας πειραματικής έρευνας αποτέλεσε και η μειωμένη αποτελεσματικότητα των πειραματικών μοντέλων που χρησιμοποιούνται για την αναπαραγωγή της NE.

Στόχος της διδακτορικής διατριβής ήταν η εκτίμηση της επίδρασης του φυσικού περιορισμού της διατροφής, της αυξημένης φόρτισης δαπέδου, της θερμικής καταπόνησης, της καταπόνησης λόγω ψύχους και του εμβολιασμού με ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο στην παθογένεια της NE και η καθιέρωση ενός πειραματικού μοντέλου αναπαραγωγής της, το οποίο να είναι πιο αξιόπιστο και να παρουσιάζει μεγαλύτερη σταθερότητα και επαναληψιμότητα.

Συνολικά σε όλη τη διάρκεια του πειραματικού μέρους της διδακτορικής διατριβής διεξήχθησαν 5 πειραματισμοί. Σε κάθε έναν από τους 4 πειραματισμούς χρησιμοποιήθηκαν 240 νεοσσοί ημέρας οι οποίοι τοποθετήθηκαν τυχαία σε 4 ομάδες των 60 ορνιθίων, με δύο επαναλήψεις για κάθε πειραματική ομάδα. Στον πέμπτο πειραματισμό, για την εκτίμηση του εμβολιασμού με ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο, χρησιμοποιήθηκαν 300 νεοσσοί ημέρας οι οποίοι τοποθετήθηκαν τυχαία σε 5 ομάδες των 60 ορνιθίων, με δύο επαναλήψεις για κάθε πειραματική ομάδα. Η διάρκεια του κάθε πειραματισμού ήταν 24 ημέρες. Σε κάθε ομάδα διεξήχθησαν 5 χρονικές δειγματοληψίες, με 12 ορνίθια ανά δειγματοληψία τη 16<sup>η</sup> ημέρα, την 21<sup>η</sup>, την 22<sup>η</sup>, την 23<sup>η</sup> και την 24<sup>η</sup> ημέρα του πειραματισμού. Τα ορνίθια θανατώθηκαν με τη χρησιμοποίηση διοξειδίου άνθρακα, νεκροτομήθηκαν και στη συνέχεια διεξήχθησαν οι προγραμματισμένες εξετάσεις.

Οι εξετάσεις που διενεργήθηκαν σε κάθε χρονική δειγματοληψία ήταν η μακροσκοπική εξέταση και βαθμολόγηση των αλλοιώσεων του εντέρου, του μυώδους στομάχου και του ήπατος, η ιστοπαθολογική εξέταση δειγμάτων του δωδεκαδακτύλου, της νήστιδας, του ειλεού και του ήπατος, η παρασιτολογική εξέταση των κοπράνων, η μικροσκοπική εξέταση νωπών επιχρισμάτων από τον εντερικό βλεννογόνο και το περιεχόμενο, η μέτρηση της τιμής του pH του περιεχομένου του δωδεκαδακτύλου, της νήστιδας, του ειλεού και των τυφλών, η μέτρηση της τιμής του ιζώδους του περιεχομένου της νήστιδας και του ειλεού, η απομόνωση του *C. perfringens* από το μυώδη στόμαχο, το δωδεκαδάκτυλο, τη νήστιδα, τον ειλέο και το ήπαρ και ο ποσοτικός προσδιορισμός του *C. perfringens* στα τυφλά. Επίσης, κατά τη διάρκεια του κάθε πειραματισμού υπολογίστηκε το ΣΒ των ορνιθίων την 1<sup>η</sup> ημέρα, την 10<sup>η</sup> ημέρα, τη 16<sup>η</sup> ημέρα, τη 17<sup>η</sup> ημέρα και την 21<sup>η</sup> ημέρα και ο ΔΜΤ στα διαστήματα 10-16 ημερών και 17-21 ημερών.

Για την πειραματική αναπαραγωγή της NE, τα ορνίθια μολύνθηκαν με *C. perfringens* 3 φορές ημερησίως για τέσσερις συνεχόμενες ημέρες, τη 17<sup>η</sup>, τη 18<sup>η</sup>, τη 19<sup>η</sup> και την 20<sup>η</sup> ημέρα και με δεκαπλάσια δόση ΕΛΔ αντικοκκιδιακού εμβολίου τη 18<sup>η</sup> ημέρα. Επιπλέον, η σύνθεση του τελικού σιτηρεσίου διαμορφώθηκε κατάλληλα, έτσι ώστε να προδιαθέτει στην εκδήλωση της NE, περιέχοντας ιχθυάλευρο και δημητριακούς καρπούς πλούσιους σε ΜΣΠ, σε υψηλή συγκέντρωση. Κανένα σιτηρέσιο δεν περιείχε αντιβιοτικούς αυξητικούς παράγοντες και αντικοκκιδιακά φάρμακα.

Στόχος του πρώτου πειραματισμού ήταν η εκτίμηση της επίδρασης του φυσικού περιορισμού της διατροφής των ορνιθίων στην παθογένεια της NE. Οι πειραματικές ομάδες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής 4: η ομάδα N, τα ορνίθια της οποίας χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες, η ομάδα SN, στα ορνίθια της οποίας εφαρμόστηκε φυσικός περιορισμός της διατροφής, η ομάδα P, τα ορνίθια της οποίας μολύνθηκαν με *C. perfringens* και με δεκαπλάσια δόση ΕΛΔ αντικοκκιδιακού εμβολίου και η ομάδα SP, στα ορνίθια της οποίας εφαρμόστηκε φυσικός περιορισμός της διατροφής και μόλυνση. Ο φυσικός περιορισμός της διατροφής εφαρμόστηκε με την απομάκρυνση των τροφοδόχων εκτός κλωβού για 12 ώρες, από τις 21:00 έως τις 9:00, τη 16<sup>η</sup>, τη 17<sup>η</sup>, τη 18<sup>η</sup> και τη 19<sup>η</sup> ημέρα. Από τα αποτελέσματα του πειραματισμού προκύπτει ότι ο φυσικός περιορισμός της διατροφής των ορνιθίων εκδηλώνει προστατευτική δράση έναντι της NE.

Στόχος του δεύτερου πειραματισμού ήταν η εκτίμηση της επίδρασης της αυξημένης φόρτισης δαπέδου στην παθογένεια της NE. Οι πειραματικές ομάδες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής 4: η ομάδα N, τα ορνίθια της οποίας χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες, η ομάδα DN, όπου η φόρτιση δαπέδου ήταν υψηλή, η ομάδα P, τα ορνίθια της οποίας

μολύνθηκαν με *C. perfringens* και με δεκαπλάσια δόση ΕΛΔ αντικοκκιδιακού εμβολίου και η ομάδα DP, όπου η φόρτιση δαπέδου ήταν υψηλή και τα ορνίθια μολύνθηκαν. Σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρίας προμήθειας των νεοσσών, ως φυσιολογική φόρτιση δαπέδου ορίστηκε τα 15 ορνίθια/m<sup>2</sup>, ενώ για την αύξηση της φόρτισης δαπέδου τοποθετήθηκαν 30 ορνίθια/m<sup>2</sup> από την ηλικία της 1<sup>ης</sup> ημέρας. Από τα αποτελέσματα του πειραματισμού προκύπτει ότι η αύξηση της φόρτισης δαπέδου προδιαθέτει στην εκδήλωση της NE και επιδεινώνει τη σοβαρότητα των αλλοιώσεων.

Στόχος του τρίτου πειραματισμού ήταν η εκτίμηση της επίδρασης της θερμικής καταπόνησης των ορνιθίων στην παθογένεια της NE. Οι πειραματικές ομάδες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής 4: η ομάδα N, τα ορνίθια της οποίας χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες, η ομάδα HN, στα ορνίθια της οποίας εφαρμόστηκε θερμική καταπόνηση, η ομάδα P, τα ορνίθια της οποίας μολύνθηκαν με *C. perfringens* και με δεκαπλάσια δόση ΕΛΔ αντικοκκιδιακού εμβολίου και η ομάδα HP, στα ορνίθια της οποίας εφαρμόστηκε θερμική καταπόνηση και μόλυνση. Ως φυσιολογική θερμοκρασία θαλάμου για ορνίθια ηλικίας 17-20 ημερών, σύμφωνα με τις προδιαγραφές της εταιρίας προμήθειας των νεοσσών, ορίστηκε η εκείνη των 25 °C. Για τη θερμική καταπόνηση των ορνιθίων η θερμοκρασία θαλάμου αυξήθηκε κατά 10 °C, φθάνοντας στους 35 °C, για 12 ώρες ημερησίως, από τις 21:00 έως τις 9:00, τη 16<sup>η</sup>, τη 17<sup>η</sup>, τη 18<sup>η</sup>, τη 19<sup>η</sup> και την 20<sup>η</sup> ημέρα του πειραματισμού. Από τα αποτελέσματα του πειραματισμού προκύπτει ότι η θερμική καταπόνηση των ορνιθίων μπορεί να προκαλέσει την εκδήλωση της NE σε ορνίθια που δεν έχουν μολυνθεί και σε συνδυασμό με τη μόλυνση να επιδεινώσει τις αλλοιώσεις.

Στόχος του τέταρτου πειραματισμού ήταν η εκτίμηση της επίδρασης της καταπόνησης των ορνιθίων λόγω ψύχους στην παθογένεια της NE. Οι πειραματικές ομάδες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής 4: η ομάδα N, τα ορνίθια της οποίας χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες, η ομάδα CN, στα ορνίθια της οποίας εφαρμόστηκε καταπόνηση λόγω ψύχους, η ομάδα P, τα ορνίθια της οποίας μολύνθηκαν με *C. perfringens* και με δεκαπλάσια δόση ΕΛΔ αντικοκκιδιακού εμβολίου και η ομάδα CP, στα ορνίθια της οποίας εφαρμόστηκε καταπόνηση λόγω ψύχους και μόλυνση. Για την καταπόνηση των ορνιθίων λόγω ψύχους η θερμοκρασία θαλάμου μειώθηκε κατά 10 °C, φθάνοντας στους 15 °C, για 12 ώρες ημερησίως, από τις 09:00 έως τις 21:00, τη 17<sup>η</sup>, τη 18<sup>η</sup>, τη 19<sup>η</sup> και την 20<sup>η</sup> ημέρα του πειραματισμού. Από τα αποτελέσματα του πειραματισμού προκύπτει ότι η καταπόνηση των ορνιθίων λόγω ψύχους επιδεινώνει τη σοβαρότητα των αλλοιώσεων της NE.

Στόχος του πέμπτου πειραματισμού ήταν η εκτίμηση της επίδρασης του εμβολιασμού των ορνιθίων με ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο στην παθογένεια της NE και η καθιέρωση

ενός πιο αποτελεσματικού πειραματικού μοντέλου αναπαραγωγής της NE. Οι πειραματικές ομάδες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής 5: η ομάδα N, τα ορνίθια της οποίας χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες, η ομάδα PN, τα ορνίθια της οποίας εμβολιάστηκαν με ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο την 1<sup>η</sup> ημέρα της ζωής τους, η ομάδα P, τα ορνίθια της οποίας μολύνθηκαν με *C. perfringens* και με δεκαπλάσια δόση ΕΛΔ αντικοκκιδιακού εμβολίου, η ομάδα M, τα ορνίθια της οποίας μολύνθηκαν με *C. perfringens* και με *E. maxima* και η ομάδα PM, τα ορνίθια της οποίας εμβολιάστηκαν με ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο και μολύνθηκαν με *C. perfringens* και με *E. maxima*. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του πειραματισμού, ο εμβολιασμός των ορνιθίων με ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο την 1<sup>η</sup> ημέρα της ζωής τους περιορίζει τη συχνότητα εμφάνισης και υποβαθμίζει τη σοβαρότητα των αλλοιώσεων της NE. Επιπλέον, η μόλυνση των ορνιθίων με *C. perfringens* και *E. maxima*, συγκριτικά με τη μόλυνση με *C. perfringens* και δεκαπλάσια δόση ΕΛΔ αντικοκκιδιακού εμβολίου, αυξάνει τη συχνότητα εμφάνισης και επιδεινώνει τη σοβαρότητα των αλλοιώσεων της NE.

Ανακεφαλαιωτικά, από όλους τους πειραματισμούς που διενεργήθηκαν στη συγκεκριμένη πειραματική έρευνα προκύπτει ότι η αυξημένη φόρτιση δαπέδου, η θερμική καταπόνηση και η καταπόνηση των ορνιθίων λόγω ψύχους προδιαθέτουν στην εκδήλωση της NE, ενώ αντίθετα, ο φυσικός περιορισμός της διατροφής και ο εμβολιασμός με το ΕΛΔ αντικοκκιδιακό εμβόλιο, εκδηλώνουν προστατευτική δράση στην εκδήλωση της NE.

ARISTOTLE UNIVERSITY OF THESSALONIKI  
SCHOOL OF VETERINARY MEDICINE  
DEPARTMENT OF CLINICAL STUDIES  
CLINIC OF FARM ANIMALS  
UNIT OF AVIAN MEDICINE

---

**THE EFFECT OF STRESS FACTORS ON THE PATHOGENESIS  
OF NECROTIC ENTERITIS IN BROILER CHICKENS**

PhD THESIS  
BY  
TSIOURIS S. VASILIOS

**SUMMARY**

Necrotic enteritis (NE) is described as a disease of high economical impact which affects health and welfare of broilers and may also pose a threat to public health. Therefore any predisposing factor to NE is regarded very important.

The effect of stress factors attributed to management practices such as feed deprivation, high stocking density, heat stress, cold stress and vaccination with live attenuated anticoccidial vaccine on the pathogenesis of NE has not been studied adequately. Therefore, the objective of the present study was to validate the effect of the above mentioned management stressors on the pathogenesis of NE by the use of an effective experimental model.

For this purpose five experiments were carried out. In each one of the four experiments 240 day old broiler chicks (Cobb 500) were randomly allocated into four experimental groups of 60 broilers each, while in the fifth experiment for the evaluation of vaccination with live attenuated anticoccidial vaccine on the pathogenesis of NE, 300 day old broilers chicken were randomly allocated into five experimental groups of 60 broilers each. Each experimental group consisted of two replicates (subgroups). The experimental period for each experiment was set to 24 days. On day 16, 21, 22, 23 and 24, six birds per subgroup were euthanized.



## ***SUMMARY***

---

The examinations conducted at each sampling day included the gross lesion scoring of intestine, gizzard and liver, the histopathology of intestine and liver, the flotation of feces, the microscopic examination of wet smears from intestinal mucosa and content, the measurement of pH of intestinal content, the measurement of viscosity of contents of jejunum and ileum, the bacterial cultivation of *C. perfringens* from liver and swab samples of gizzard, duodenum, jejunum, and ileum and the quantification of *C. perfringens* in cecum. Moreover, broilers were weighed on day 1, 9, 16, 17 and 21, while feed conversion ratio was calculated for the periods of 10-16 days of age and 17-21 days of age.

In order to reproduce the NE, an experimental challenge model using *C. perfringens* and tenfold dose of a live anticoccidial vaccine was adopted. Experimentally challenged birds were orally infected three times per day with  $4 \times 10^8$  cfu *C. perfringens* for four consecutive days (days 17, 18 19 and 20). The used strain was resistant to rifampicin. For the induction of NE, at day 18 birds were also inoculated orally with tenfold dose of a live anticoccidial vaccine (Paracox TM-5) which consisted of oocysts of *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. mitis* and *E. tenella*. Broilers in all groups were fed a specially formulated three phase ratio (starter 1-9d, grower 10-16d and finisher 17-24d), which included large quantities of wheat, rye and soya. In the finisher ration soya was replaced by fishmeal which acted as predisposing factor of NE. The use of antibiotic growth promoters and anticoccidial drugs was avoided.

The aim of the first experiment was to investigate the effect of feed deprivation on the pathogenesis of NE in broiler chickens. The treatment groups used in this experiment were group N served as negative control, group SN where feed deprivation was applied, group P where birds were experimentally challenged with *C. perfringens* and tenfold dose of a live attenuated anticoccidial vaccine and group SP where birds were both experimentally challenged and suffered starvation. In groups where feed deprivation was applied, the feed was withdrawn at days 16, 17, 18 and 19 for 12 hours daily starting from 21:00 to 09:00. The results of the experiment demonstrated that starvation has a significant protective effect against the experimentally induced NE in broilers, by limiting the *C. perfringens* caeca counts and reducing the severity of the NE lesions.

The objective of second experiment was to assess the influence of high stocking density as a predisposing factor in NE in broiler chickens. The treatment groups used in this experiment were control group N where birds were at normal stocking density (15 birds/m<sup>2</sup>) and not challenged, group DN where birds were raised at 50% increased stocking density from 1<sup>st</sup> day (30 birds/m<sup>2</sup>), group P where birds were raised at standard stocking density and challenged with *C. perfringens* and with tenfold dose of a live attenuated anticoccidial

vaccine and group DP where birds were challenged and raised at increased stocking density as described above. The experiment provides evidence that high stocking density increased the frequency and severity of NE.

The purpose of third experiment was to investigate the effects of heat stress on the pathogenesis of NE in broiler chickens. The treatment groups used in this experiment were group N served as negative control, group HN where heat stress (35°C) was applied, group P where birds were experimentally challenged with *C. perfringens* and with tenfold dose of a live attenuated anticoccidial vaccine, and group HP where birds were both experimentally challenged and suffered heat stress. In groups where heat stress was applied, temperature was increased from 25°C (the recommended temperature for broilers at the respective age) to 35°C at days 16, 17, 18, 19 and 20 for 12 hours daily starting from 21:00 to 09:00h. Heat stress predisposes broilers to the manifestation of NE, because it provokes the occurrence of NE lesions in non challenged birds and also caused further increase of the severity of lesions in challenged birds.

The objective of fourth experiment was to assess the influence of cold stress on the pathogenesis of NE in broiler chickens. The treatment groups used in this experiment were group N served as negative control, group CN where cold stress (15 °C) was applied, group P where birds were experimentally challenged with *C. perfringens* and tenfold dose of a live attenuated anticoccidial vaccine and group CP where birds were both experimentally challenged and suffered cold stress as described above. In groups where cold stress was applied, temperature was decreased from 25°C (the recommended temperature for broilers at the respective age) to 15°C at days 17, 18, 19 and 20 for 12 hours daily starting from 9:00 to 21:00. The experiment provides evidence that cold stress increased severity of subclinical NE.

The objective of fifth experiment was to assess the influence of live anticoccidial vaccine on the pathogenesis of NE in broiler chickens and to establish a more efficient experimental model for the reproduction of NE. The treatment groups used in this experiment were group N served as negative control, group PN where birds vaccinated at day 1 with live attenuated anticoccidial vaccine, group P where birds were experimentally challenged with *C. perfringens* and tenfold dose of a live attenuated anticoccidial vaccine, group M where birds were challenged with *C. perfringens* and *E. maxima* and group PM where birds vaccinated at day 1 and were challenged with *C. perfringens* and *E. maxima*. The study provides evidence that live anticoccidial vaccine decreased the frequency and severity of experimental NE. Furthermore, the challenge of birds with *C. perfringens* and *E. maxima*

## ***SUMMARY***

---

increased the frequency and aggregated the severity of NE lesions compared to challenge with *C. perfringens* and tenfold dose of a live anticoccidial vaccine.

It is evident from our studies that among the management factors in intensive broiler production systems, high stocking density, heat stress and cold stress pose a significant predisposal role for the induction of NE, while feed deprivation and vaccination against coccidiosis act protectively against it.

**BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ****Ξενόγλωσση.**

1. **Aarestrup F.** (2003). Effects of termination of AGP use on antimicrobial resistance in food animals. 6-11 p. Working papers for the WHO international review panels evaluation. *Document WHO/CDS/CPE/ZFK/2003.1a*. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
2. **Acamovic T.** (2001). Commercial application of enzyme technology for poultry production. *World's Poultry Science Journal*. **57**: 225-242.
3. **Acamovic T. and Brooker J.** (2005). Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. *Proceedings of the Nutrition Society*. **64**: 403-412.
4. **Acamovic T., Stewart C. and Pennycott T.** (2004). Poisonous plants and related toxins. Cabi Publishing, Wallingford, UK.
5. **Aksit M., Yalcin S., Ozkan S., Metin K. and Ozdemir D.** (2006). Effects of temperature during rearing and crating on stress parameters and meat quality of broilers. *Poultry Science*. **85**: 1867-1874.
6. **Al-Ghamdi Z.** (2008). Effects of commutative heat stress on immune responses in broiler chickens reared in closed system. *International Journal of Poultry Science*. **7**: 964-968.
7. **Allen P. and Fetterer R.** (2002). Recent advances in biology and immunobiology of *Eimeria* species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. *Clinical Microbiology Reviews*. **15**: 58-65.
8. **Al-Sheikhly F. and Al-Saieg A.** (1980). Role of coccidia in the occurrence of necrotic enteritis of chickens. *Avian Diseases*. **24**: 324-333.
9. **Al-Sheikhly F. and Truscott R.** (1977 $\alpha$ ). The pathology of necrotic enteritis of chickens following infusion of broth cultures of *Clostridium perfringens* into the duodenum. *Avian Diseases*. **21**: 230-240.
10. **Al-Sheikhly F. and Truscott R.** (1977 $\beta$ ). The interaction of *Clostridium perfringens* and its toxins in the production of necrotic enteritis of chickens. *Avian Diseases*. **21**: 256-263.
11. **Al-Sheikhly F. and Truscott R.** (1977 $\gamma$ ). The pathology of necrotic enteritis of chickens following infusion of crude toxins of *Clostridium perfringens* into the duodenum. *Avian Diseases*. **21**: 241-255.
12. **Altan Ö., Pabuçcuoğlu A., Altan A., Konyalıoğlu S. and Bayraktar H.** (2003). Effect of heat stress on oxidative stress, lipid peroxidation and some stress parameters in broilers. *British Poultry Science*. **44**: 545-550.
13. **Alzueta C., Rodriguez M., Cutuli M., Rebole A., Ortiz L., Centeno C. and Trevino J.** (2003). Effect of whole and demucilaged linseed in broiler chicken diets on digesta viscosity, nutrient utilisation and intestinal microflora. *British Poultry Science*. **44**: 67-74.
14. **Andersson A., Ronner U. and Granum P.** (1995). What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? *International Journal of Food Microbiology*. **28**: 145-155.
15. **Andrews S., Omed H. and Phillips C.** (1997). The effect of a single or repeated period of high stocking density on the behaviour and response to stimuli in broiler chickens. *Poultry Science*. **76**: 1655-1660.

16. **Annett C., Viste J., Chirino-Tejo M., Classen H., Middleton D. and Simko E.** (2002). Necrotic enteritis: effects of barley, wheat and corn diets on proliferation of *Clostridium perfringens* type A. *Avian Pathology*. **31**: 599-602.
17. **Apajalahti J., Kettunen A. and Graham H.** (2004). Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. *World's Poultry Science Journal*. **60**: 223-232.
18. **Apeldoorn E., Schrama J., Mashaly M. and Parmentier H.** (1999). Effect of melatonin and lighting schedule on energy metabolism in broiler chickens. *Poultry Science*. **78**: 223-229.
19. **Arnould U. and Faure J.** (2003). Use of pen space and activity of broiler chickens reared at two different densities. *Applied Animal Behaviour Science*. **84**: 281-296.
20. **Asaoka Y., Yanai T., Hirayama H., Une Y., Saito E., Sakai H., Goryo M., Fukushi H. and Masegi T.** (2004). Fatal necrotic enteritis associated with *Clostridium perfringens* in wild crows (*Corvus macrorhynchos*). *Avian Pathology*. **33**: 19-24.
21. **Baba E., Fukata T. and Arakawa A.** (1982). Establishment and persistence of *Salmonella typhimurium* infection stimulated by *Eimeria tenella* in chickens. *Research of Veterinary Science*. **33**: 95-98.
22. **Baba E., Fuller A., Gilbert J., Thayer S. and McDougald L.** (1992). Effects of *Eimeria brunetti* infection and dietary zinc on experimental induction of necrotic enteritis in broiler chickens. *Avian Diseases*. **36**: 59-62.
23. **Baba E., Ikemoto T., Fukata T., Sasai K., Arakawa A. and McDougald L.** (1997). Clostridial population and the intestinal lesions in chickens infected with *Clostridium perfringens* and *Eimeria necatrix*. *Veterinary Microbiology*. **54**: 301-308.
24. **Bach-Knudsen K.** (1997). Carbohydrate and lignin contents of plant materials used in animal feeding. *Animal Feed Science and Technology*. **67**: 319-338.
25. **Bailey J.** (1988). Integrated colonization control of Salmonella in poultry. *Poultry Science* **67**: 928-932.
26. **Bains B.** (1968). Necrotic enteritis of chickens. *Australian Veterinary Journal*. **44**: 40.
27. **Balnave D. and Muheereza S.** (1997). Improving eggshell quality at high temperatures with dietary sodium bicarbonate. *Poultry Science*. **76**: 588-593.
28. **Balog J., Anthony N., Cooper M., Kidd B., Huff G., Huff W. and Rath N.** (2000). Ascites syndrome and related pathologies in feed restricted broilers raised in a hypobaric chamber. *Poultry Science*. **79**: 318-323.
29. **Barbara A., Trinh H., Glock R. and Songer J.** (2008). Necrotic enteritis-producing strains of *Clostridium perfringens* displace non-necrotic enteritis strains from the gut of chicks. *Veterinary Microbiology*. **126**: 377-382.
30. **Barnes E., Mead G., Barnum D. and Harry E.** (1972). The intestinal flora of the chicken in the period 2 to 6 weeks of age, with particular reference to the anaerobic bacteria. *British Poultry Science*. **13**: 311-326.
31. **Bartlett J. and Smith M.** (2003). Effects of different levels of zinc on the performance and immunocompetence of broilers under heat stress. *Poultry Science*. **82**: 1580-1588.
32. **Barton M.** (2000). Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nutrition research reviews*. **13**: 279-299.
33. **Bates J., Jordens J. and Selkon J.** (1993). Evidence for an animal origin of vancomycin resistant enterococci. *Lancet*. **342**: 490-491.

34. **Bedford M.** (2000). Removal of antibiotic growth promoters from poultry diets: implications and strategies to minimise subsequent problems. *World Poultry Science Journal*. **56**: 347-365.
35. **Bedford M. and Apajalahti J.** (2000). Microbial interactions in the response to exogenous enzyme utilization. Bedford M. and Partridge G. (Eds). *Enzymes in farm animal nutrition*. 299-314 p., Cabi Publishing. Wallingford, UK.
36. **Bedford M. and Classen H.** (1992). Reduction of intestinal viscosity through manipulation of dietary rye and pentosanase concentration is effected through changes in the carbohydrate composition of the intestinal aqueous phase and results in improved growth rate and food conversion efficiency of broiler chicks. *Journal of Nutrition*. **122**: 560-569.
37. **Bedford M. and Schulze H.** (1998). Exogenous enzymes for pigs and poultry. *Nutrition Research Reviews*. **11**: 91-114.
38. **Bell D.** (1987). Is molting still a viable replacement alternative? *Poultry Tribune*. **95**: 32-35.
39. **Ben Nathan D., Heller E. and Perek M.** (1976). The effect of short heat stress upon leucocyte count, plasma corticosterone level, plasma and leucocyte ascorbic acid content. *British Poultry Science*. **17**: 481-485.
40. **Bennetts H.** (1930). *Bacillus welchii* and bowel lesions. *Australian Veterinary Journal*. **4**: 153-154.
41. **Benyi K. and Habi H.** (1998). Effects of food restriction during the finishing period on the performance of broiler chickens. *British Poultry Science*. **39**: 423-425.
42. **Berkhoff H.** (1985). *Clostridium colinum* spp., the causative agent of ulcerative enteritis (quail disease) in quail, chickens, and pheasants. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **35**: 155-159.
43. **Bernier G., Phaneuf J. and Filion R.** (1974). Necrotic enteritis in broilers. I. Clinico-pathological aspect. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. **38**: 280-285.
44. **Bernier G., Phaneuf J. and Filion R.** (1977). Necrotic enteritis in broiler chickens. Iii. Study of the factors favoring the multiplication of *Clostridium perfringens* and the experimental transmission of the disease. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. **41**: 112-116.
45. **Bhatty R.** (1995). Nutrient composition of whole flaxseed and flaxseed meal. Cunnane S. and Thompson L. (Eds). *Flaxseed in Human Nutrition*. 22-42 p. Champaign, IL, Academic Press.
46. **Biberstein E.** (1990). The *Clostridia*. Biberstein E. and Zee Y. (Eds). *Review of Veterinary Microbiology*. 295-310 p., Blackwell Scientific Publications, Inc., London. UK.
47. **Biggs P.** (1982). The world of poultry disease. *Avian Pathology*. **11**: 281-300.
48. **Bilgili S. and Hess J.** (1995). Placement density influences broiler carcass grade and meat yields. *Journal of Applied Poultry Research*. **4**: 384-389.
49. **Blair R., Newberry R. and Gardinen E.** (1993). Effects of lighting pattern and dietary tryptophan supplementation on growth and mortality in broilers. *Poultry Science*. **72**: 495-502.
50. **Boa-Amponsem K., Yang A., Prahraj N., Dunnington E., Gross W. and Siegel P.** (1997). Impact of alternate-day feeding cycles on immune and antibacterial responses of white leghorn chicks. *Journal Applied Poultry Research*. **6**: 123-127
51. **Bolder N., Wagenaar J., Putirulan F., Veldman K. and Sommer M.** (1999). The effect of Flavophospholipol (Flavomycin) and Salinomycin sodium (Sacox) on the excretion of *Clostridium*

- perfringens*, *Salmonella enteritidis* and *Campylobacter jejuni* in broilers after experimental infection. *Poultry Science*. **78**: 1681-1689.
52. **Bolton W., Thompson R., Jones R. and Dewar W.** (1972). Effect of stocking density on performance of broiler chicks. *British Poultry Science*. **13**: 157-162.
53. **Bonnet S., Geraert P., Lessire M., Carre B. and Guillaumin S.** (1997). Effect of high ambient temperature on feed digestibility in broilers. *Poultry Science*. **76**: 857-863.
54. **Boulliane M.** (1999). Can we farm poultry without antimicrobials? *Publication of the Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs*. Queen's Printer for Ontario, Canada. <http://www.gov.on.ca/OMAFRA/english/livestock/animalcare/amr/facts/boulianne.htm>.
55. **Branton S., Lott B., Deaton J., Maslin W., Austin F., Pote L., Keirs R., Latour M. and Day E.** (1997). The effect of added complex carbohydrates or added dietary fibre on necrotic enteritis lesions in broiler chickens. *Poultry Science*. **76**: 24-28.
56. **Branton S., Reece F. and Hagler W.** (1987). Influence of a wheat diet on mortality of broiler chickens associated with necrotic enteritis. *Poultry Science*. **66**: 1326-1330.
57. **Brennan J., Bagg R., Barnum D., Wilson J. and Dick P.** (2001). Efficacy of narasin in the prevention of necrotic enteritis in broiler chickens. *Avian Diseases*. **45**: 210-214.
58. **British Oil and Cake Mills.** (1964). *Common Diseases of Poultry*. Erith: British Oil and Cake Mills.
59. **Brock T., Madigan M., Martinko J. and Parker J.** (1994). *Biology of microorganisms*. 7<sup>th</sup> Edition, Prentice-Hall Inc., New Jersey, USA.
60. **Brooker J. and Acamovic T.** (2005). Phytochemicals in livestock production systems. *Animal feed science and technology*. **121**: 1-4.
61. **Brooks M., Sterne M. and Warrack G.** (1957). A reassessment of the criteria used for type differentiation of *Clostridium perfringens*. *Journal of Pathology and Bacteriology*. **74**: 185-195.
62. **Broussard C., Hofacre C., Page R. and Fletcher O.** (1986). Necrotic enteritis in cage-reared commercial layer pullets. *Avian Diseases*. **30**: 617-619.
63. **Bruggeman V., Vanmontfort D., Renaville R., Portetelle D. and Decuypere E.** (1997). The effect of food intake from two weeks of age to sexual maturity on plasma growth hormone, insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor-binding proteins, and thyroid hormones in female broiler breeder chickens. *General and Comparative Endocrinology*. **107**: 212-220.
64. **Bry L., Falk P., Midtvedt T. and Gordon J.** (1996). A model of host-microbial interactions in an open mammalian ecosystem. *Science*. **273**: 1380-1383.
65. **Bryant A., Bayer C., Aldape M., Wallace R., Titball R. and Stevens D.** (2006). *Clostridium perfringens* phospholipase C induced platelet/leukocyte interactions impede neutrophil diapedesis. *Journal of Medical Microbiology*. **55**: 495-504.
66. **Brynstad S. and Granum P.** (2002). *Clostridium perfringens* and foodborne infections. *International Journal of Food Microbiology*. **74**: 195-202.
67. **Burkholder K., Thompson K., Einstein M., Applegate T. and Patterson J.** (2008). Influence of stressors on normal intestinal microbiota, intestinal morphology, and susceptibility to *Salmonella enteritidis* colonization in broilers. *Poultry Science*. **87**: 1734-1741.

68. **Buys N., Buyse J., Hassanzadeh M. and Decuypere E.** (1998). Intermittent lighting reduces the incidence of ascites in broilers: an interaction with protein content of feed on performance and the endocrine system. *Poultry Science*. **77**: 54-61.
69. **Buyse J., Kuhn E. and Decuypere E.** (1996). The use of intermittent lighting in broiler raising. 1. Effect on broiler performance and efficiency of nitrogen retention. *Poultry Science* **75**: 589-594.
70. **Byrd J., Corrier D., Hume M., Bailey R., Stanker L. and Hargis B.** (1998). Effect of feed withdrawal on *Campylobacter* in the crops of market-age broiler chickens. *Avian Diseases*. **42**: 802-806.
71. **Calderon A., Buck G. and Doyle R.** (1997). Lectin-microorganism complexes. Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry. *Proceedings from the 17th International Lectin Meeting*. Würzburg, Germany.
72. **Calet C.** (1965). The relative value of pellets versus mash and grain in poultry nutrition. *World's Poultry Science Journal*. **21**: 23-52.
73. **Carre B.** (2004). Causes for variation in digestibility of starch among feedstuffs. *World's Poultry Science Journal*. **60**: 76-89.
74. **Casewell M., Friis C., Granell E., McMullin P. and Phillips I.** (2003). The European ban on growth-promoting antibiotics and its consequences for human and animal health. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **52**: 159-161.
75. **Cato E., George W. and Finegold S.** (1986). Genus *Clostridium*. Sneath P., Mair N., Sharpe M. and Williams H. (Eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 1179-1182 p., Baltimore, USA.
76. **Cebra J.** (1999). Influences of microbiota on intestinal immune system development. *American Journal of Clinical Nutrition*. **69**:1046S-1051S.
77. **Cervantes H.** (2004). Why responsible antibiotic use enhances animal and human health. *Proceedings of the 2004 Midwest Poultry Federation Convention*. 201–210 p., St. Paul, Minnesota, USA.
78. **Cervantes H. and Jensen L.** (1984). Effect of monensin on broiler chicks. *Poultry Science*. **63** (Suppl.1): 77.
79. **Chakraborty G., Chakraborty C., Bhattacharyya D., Bhattacharyya S., Goswami U. and Bhattacharyya H.** (1984). Necrotic enteritis in poultry in West Bengal. *Indian Journal of Comparative Microbiology, Immunology and Infectious Diseases*. **5**: 54-57.
80. **Chapman H.** (1982). The use of enzyme electrophoresis for the identification of the species of *Eimeria* present in field isolates of coccidia. *Parasitology*. **85**: 437-442.
81. **Chapman H.** (1999). Anticoccidial drugs and their effects upon the development of immunity to *Eimeria* infections in poultry. *Avian Pathology*. **28**: 521-535.
82. **Chapman H.** (2000). Practical use of vaccines for the control of coccidiosis in the chicken. *World's Poultry Science Journal*. **56**: 7-20.
83. **Chapman H. and Cherry T.** (1997). Eye spray vaccination: infectivity and development of immunity to *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella*. *Journal of Applied Poultry Research*. **6**: 274-278.
84. **Chapman H., Cherry T., Danforth H., Richards G., Shirley M. and Williams R.** (2002). Sustainable coccidiosis control in poultry production: the role of live vaccines. *International Journal for Parasitology*. **32**: 617-629.



85. **Choct M.** (2001). Enzyme supplementation of poultry diets based on viscous cereals. Bedford M. and Partridge G. (Eds). *Enzymes in farm animal nutrition*. 145-160 p., Cabi Publishing. Wallingford, UK.
86. **Choct M.** (2006). Enzymes for the feed industry: past, present and future. *World's Poultry Science Journal*. **62**: 5-15.
87. **Choct M., Hughes R. and Bedford M.** (1999). Effects of a xylanase on individual bird variation, starch digestion throughout the intestine, and ileal and caecal volatile fatty acid production in chickens fed wheat. *British Poultry Science*. **40**: 419-422.
88. **Choct M., Hughes R., Wang J., Bedford M., Morgan A. and Annison G.** (1996). Increased small intestinal fermentation is partly responsible for the anti-nutritive activity of non-starch polysaccharides in chickens. *British Poultry Science*. **37**: 609-621.
89. **Clarke E. and Wiseman J.** (2005). Effects of variable trypsin inhibitor content of soyabean meal on true and apparent ileal digestibility of amino acids and pancreas size in broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*. **121**: 125-138.
90. **Collier C., Hofacre C., Payne A., Anderson D., Kaiser P., Mackie R. and Gaskins H.** (2008). Coccidia-induced mucogenesis promotes the onset of necrotic enteritis by supporting *Clostridium perfringens* growth. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. **122**: 104-115.
91. **Collier C., Van der Klis J., Deplancke B., Anderson D. and Gaskins H.** (2003). Effects of tylosin on bacterial mucolysis, *Clostridium perfringens* colonization, and intestinal barrier function in a chick model of necrotic enteritis. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. **47**: 3311-3317.
92. **Collins M., Lawson P., Willems A., Cordoba J., Fernandez-Garayzabal J., Garcia P., Cai J., Hippe H. and Farrow J.** (1994). The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **44**: 812-826.
93. **Cooper K. and Songer G.** (2009). Necrotic enteritis in chickens: A paradigm of enteric infection by *Clostridium perfringens* type A. *Anaerobe*. **15**: 55-60.
94. **Cooper K., Trinh H. and Songer G.** (2009). Immunization with recombinant alpha toxin partially protects broiler chicks against experimental challenge with *Clostridium perfringens*. *Veterinary Microbiology*. **133**: 92-97.
95. **Cornetto T. and Estevez I.** (2001). Behaviour of the domestic fowl in presence of vertical panels. *Poultry Science*. **80**: 1455-1462.
96. **Cornetto T., Estevez I. and Douglass L.** (2002). Using artificial cover to reduce aggression and disturbances in domestic fowl. *Applied Animal Behaviour Science*. **75**: 325-336.
97. **Cowen B., Schwartz L., Wilson R. and Ambrus S.** (1987). Experimentally induced necrotic enteritis in chickens. *Avian Diseases*. **31**: 904-906.
98. **Craig J., Craig J. and Vargas J.** (1986). Corticosterone and other indicators of hens' well-being in four laying house environments. *Poultry Science*. **65**: 856-863.
99. **Craven S.** (2000). Colonization of the intestinal tract by *Clostridium perfringens* and fecal shedding in diet-stressed and unstressed broiler chickens. *Poultry Science*. **79**: 843-849.
100. **Craven S., Cox N., Bailey J. and Cosby D.** (2003). Incidence and tracking of *Clostridium perfringens* through an integrated broiler chicken operation. *Avian Diseases*. **47**: 707-711.

101. **Craven S., Cox N., Stern N. and Mauldin J.** (2001α). Prevalence of *Clostridium perfringens* in commercial broiler hatcheries. *Avian Diseases*. **45**: 1050-1053.
102. **Craven S., Stern N., Bailey J. and Cox N.** (2001β). Incidence of *Clostridium perfringens* in broiler chickens and their environment during production and processing. *Avian Diseases*. **45**: 887-896.
103. **Craven S., Stern N., Cox N., Bailey J. and Berrang M.** (1999). Caecal carriage of *Clostridium perfringens* in broiler chickens given mucosal starter culture. *Avian Diseases*. **43**: 484-490.
104. **Craven S., Stern N., Line E., Bailey J., Cox N. and Fedorka-Cray P.** (2000). Determination of the incidence of *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, and *Clostridium perfringens* in wild birds near broiler chicken houses by sampling intestinal droppings. *Avian Diseases*. **44**: 715-720.
105. **Cravener T., Roush W. and Mashaly M.** (1992). Broiler production under varying population-densities. *Poultry Science*. **71**: 427-433.
106. **Crompton D.** (1976). Malfunctioning of the gut: parasitism. Boorman K. and Freeman B. (Eds). *Digestion in the fowl*. 193-245 p., British Poultry Science Ltd., Edinburgh, UK.
107. **Current W., Upton S. and Long P.** (1990). Taxonomy and life cycles. Long P. (Ed.), *Coccidiosis of Man and Domestic Animals*. 1-17 p., CRC Press, Boca Raton, Florida. USA.
108. **Dabbert C., Lochmiller R. and Teeter R.** (1997). Effects of acute thermal stress on the immune system of the Northern Bobwhite (*Colinus virginianus*). *Auk*. **114**: 103-109.
109. **Dahiya J., Hoehler D., Wilkie D., Van Kessel A. and Drew M.** (2005). Dietary glycine concentration affects intestinal *Clostridium perfringens* and lactobacilli populations in broiler chickens. *Poultry Science*. **84**: 1875-1885.
110. **Dahiya J.** (2007). Nutritional strategies to control *Clostridium perfringens* in gastrointestinal tract of broiler chickens. *PhD Thesis*. Department of Animal and Poultry Science, University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada.
111. **Dalloul A. and Lillehoj S.** (2005). Recent advances in immunomodulation and vaccination strategies against coccidiosis. *Avian Diseases*. **49**: 1-8.
112. **Danforth H.** (1998). Use of live oocyst vaccines in the control of avian coccidiosis: experimental studies and field trials. *International Journal for Parasitology*. **28**: 1099-1109.
113. **Danicke S.** (2002). Prevention and control of mycotoxins in the poultry production chain: a European perspective. *World's Poultry Science Journal*. **58**: 451-467.
114. **Danicke S., Vahjen W., Simon O. and Jeroch H.** (1999). Effects of dietary fat source and xylanase supplementation to rye-based broiler diets on selected bacterial groups adhering to the intestinal epithelium, on transit time of feed, and on nutrient digestibility. *Poultry Science*. **78**: 1292-1299.
115. **Das B., Dutta G., Daube G. and Phukan A.** (1997). Characterization of *Clostridium perfringens* isolated from necrotic enteritis of fowls. *Indian journal of animal sciences*. **67**: 35-36.
116. **Dawkins M., Donnelly C. and Jones T.** (2004). Chicken welfare is influenced more by housing conditions than by stocking density. *Nature*. **427**: 342-344.
117. **Dawson W., Marsh R. and Yacoe M.** (1983). Metabolic adjustments of small passerine birds for migration and cold. *American Journal of Physiology*. **245**: 755-767.
118. **Dawson W. and Whittow G.** (2000). Regulation of body temperature. Whittow G. C. (Ed.). *Sturkie's Avian Physiology*. 5<sup>th</sup> Edition. 343-390 p., Academic Press.

119. **De Jong I., van Voorst S., Ehlhardt D. and Blokhuis H.** (2002). Effects of restricted feeding on physiological stress parameters in growing broiler breeders. *British Poultry Science*. **43**: 157-168.
120. **Deaton J., Reece F. and Vardaman T.** (1968). Effect of temperature and density on broiler performance. *Poultry Science*. **47**: 293-300.
121. **Deaton J., Reece F., McNaughton J. and Lott B.** (1981). Effect of differing temperature cycles on egg shell quality and layer performance. *Poultry Science*. **60**: 733-737.
122. **Decuyper E., Van Wambeke F., Vermaut S., Buyse J., Cokalaere M., Flo G. and De Groote G.** (1994). Autonomous feed restriction of broiler breeder pullets: jojoba meal, zinc oxide and propionic acid supplementation. *Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Conference on jojoba and its uses*. 137-141 p. Catamarca, Argentina.
123. **Defra.** (2002). Meat Chickens and Breeding Chickens. *Code of recommendations for the welfare of livestock*. PB7275.
124. **Demas G., Chefer V., Talan M. and Nelson R.** (1997). Metabolic costs of mounting an antigen-stimulated immune response in adult and aged C57BL/6J mice. *American Journal of Physiology*. **273**: 1631-1637.
125. **De Plancke B., Vidal O., Ganessunker D., Donovan S., Mackie R. and Gaskins H.** (2002). Selective growth of mucolytic bacteria including *Clostridium perfringens* in a neonatal piglet model of total parenteral nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*. **76**: 1117-1125.
126. **Devriese L., Daube G., Hommez J. and Haesebrouck F.** (1993). In vitro susceptibility of *Clostridium perfringens* isolated from farm animals to growth-enhancing antibiotics. *Journal of Applied Bacteriology*. **75**: 55-57.
127. **Dhillon A., Roy P., Lauerman L., Schaberg D., Weber S., Bandli D. and Wier F.** (2004). High mortality in egg layers as a result of necrotic enteritis. *Avian Diseases*. **48**: 675-680.
128. **Dibner J. and Richards J.** (2005). Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poultry Science*. **84**: 634-643.
129. **Dibner J., Richards J. and Knight C.** (2008). Microbial imprinting in gut development and health. *Journal of Applied Poultry Research*. **17**: 174-178.
130. **D'mello J.** (1997). Handbook of plant and fungal toxicants. New York CRC Press, Boca Raton, USA.
131. **Donkoh A.** (1989). Ambient temperature: a factor affecting performance and physiological response of broiler chickens. *International Journal of Biometeorology*. **33**: 259-265.
132. **Dozier W., Thaxton J., Branton S., Morgan G., Miles D., Roush W., Lott B. and Vizzier-Thaxton Y.** (2005). Stocking density effects on growth performance and processing yields of heavy broilers. *Poultry Science*. **84**: 1332-1338.
133. **Dozier W., Thaxton J., Purswell J., Olanrewaju H., Branton S. and Roush W.** (2006). Stocking density effects on male broilers grown to 1.8 kilograms of BW. *Poultry Science*. **85**: 344-351.
134. **Drew M., Syed N., Goldade B., Laarveld B. and Van Kessel A.** (2004). Effects of dietary protein source and level on intestinal populations of *Clostridium perfringens* in broiler chickens. *Poultry Science*. **83**: 414-420.
135. **Droual R., Farver T. and Bickford A.** (1995). Relationship of sex, age, and concurrent intestinal disease to necrotic enteritis in turkeys. *Avian Diseases*. **39**: 599-605.

136. **Droual R., Shivaprasad H. and Chin R.** (1994). Coccidiosis and necrotic enteritis in turkeys. *Avian Diseases*. **38**: 177-183.
137. **Drouin P.** (1999). *Filieres Avicoles*: 78-79.
138. **Dumoncaux T., Hill J., Hemmingsen S. and Van Kessel A.** (2006). Characterization of intestinal microbiota and response to dietary virginiamycin supplementation in the broiler chicken. *Applied Environmental Microbiology*. **72**: 2815-23.
139. **Edgar S. and King D.** (1952). Breeding and immunizing chickens for resistance to coccidiosis. *Ann. Rep. Alabama Polytech. Inst. Agr. Exp. Stn.* **62/63**: 36-37.
140. **Ekstrand C.** (1993). Effects of stocking density on the health, behaviour and productivity of broilers, a literature review. *Agris Record*. **32**: 40-46.
141. **Ekstrand C. and Carpenter T.** (1998). Temporal aspects of foot-pad dermatitis in Swedish broilers. *Acta Veterinaria Scandinavica*. **39**: 229-236.
142. **Ekstrand C., Algers B. and Svedberg J.** (1997). Rearing conditions and foot-pad dermatitis in Swedish broiler chickens. *Preventive Veterinary Medicine*. **31**: 167-174.
143. **Eleazer T. and Harrell J.** (1976). *Clostridium perfringens* infection in turkey poults. *Avian Diseases*. **20**: 774-776.
144. **El-Husseiny O. and Creger C.** (1980). The effect of ambient temperature on carcass energy gain in chickens. *Poultry Science*. **59**: 2307-2311.
145. **Elwinger K., Berndtson E., Engstrom B., Fossum O. and Waldenstedt L.** (1998). Effect of antibiotic growth promoters and anticoccidials on growth of *Clostridium perfringens* in the caeca and on performance of broiler chickens. *Acta Veterinaria Scandinavica*. **39**: 433-441.
146. **Elwinger K., Engstrom B., Berndtson E., Fossum O. and Teglof B.** (1992α). The effects of narasin on *Clostridium perfringens* in caeca and the occurrence of necrotic enteritis in broiler chickens. *Proceedings 19<sup>th</sup> World's Poultry Congress*. 580-584 p., Amsterdam, The Netherlands.
147. **Elwinger K., Schneitz C., Berndtson E., Fossum O., Teglof B. and Engstom B.** (1992β). Factors affecting the incidence of necrotic enteritis, caecal carriage of *Clostridium perfringens* and bird performance in broiler chicks. *Acta Veterinaria Scandinavica*. **33**: 369-378.
148. **Engberg R., Hedemann M. and Jensen B.** (2002). The influence of grinding and pelleting of feed on the microbial composition and activity in the digestive tract of broiler chickens. *British Poultry Science*. **43**: 569-579.
149. **Engberg R., Hedemann M., Leser T. and Jensen B.** (2000). Effect of zinc bacitracin and salinomycin on intestinal microflora and performance of broilers. *Poultry Science*. **79**: 1311-1319.
150. **Engberg R., Hedemann M., Steinfeldt S. and Jensen B.** (2004). Influence of whole wheat and xylanase on broiler performance and microbial composition and activity in the digestive tract. *Poultry Science*. **83**: 925-38.
151. **Engstrom B., Fermer C., Lindberg A., Saarinen E., Baverud V. and Gunnarsson A.** (2003). Molecular typing of isolates of *Clostridium perfringens* from healthy and diseased poultry. *Veterinary Microbiology*. **94**: 225-235.
152. **Ernik F. and Bedrnik P.** (2001). Controlling coccidiosis in broiler growing. *Poultry International*. **40**: 36-42.

153. **Estevez I.** (1994). Efecto del tamaño de grupo y de las condiciones de manejo en el comportamiento y uso del espacio del gallo doméstico (*Gallus gallus domesticus*). *PhD thesis*. University of Cordoba, Spain.
154. **Estevez I.** (2007). Density allowances for broilers: where to set the limits? *Poultry Science*. **86**: 1265-1272.
155. **Estevez I., Newberry R. and Arias de Reyna L.** (1997). Broiler chickens: A tolerant social system? *Etologia*. **5**: 19-29.
156. **European Commission.** (2007). Council Directive 2007/43/EC of 28 June 2007 laying down minimum rules for the protection of chickens kept for meat production. 19-28 p., *Official Journal L*, **182**, 12/07/2007,
157. **Ewing W. and Cole D.** (1994). *The Living Gut*. Context, Dungannon, Ireland.
158. **Fattori T., Wilson H., Harms R. and Miles R.** (1991). Response of broiler breeder females to feed restriction below recommended levels. 1. Growth and reproductive performance. *Poultry Science*. **70**: 26-36.
159. **Fayer R. and Reid W.** (1982). Control of coccidiosis. Long P. (Ed.). *The Biology of the Coccidia*. 453-487 p., Edward Arnold Publishing. London, UK.
160. **Febrer K., Jones T., Donnelly C. and Dawkins M.** (2006). Forced to crowd or choosing to cluster? Spatial distribution indicates social attraction in broiler chickens. *Animal Behaviour*. **72**: 1291-1300.
161. **Feddes J., Emmanuel E. and Zuidhof M.** (2002). Broiler performance, BW variance, feed and water intake, and carcass quality at different stocking densities. *Poultry Science*. **81**: 774-779.
162. **Feng J., Zhang M., Zheng S., Xie P. and Ma A.** (2008). Effects of high temperature on multiple parameters of broilers in vitro and in vivo. *Poultry Science*. **87**: 2133-2139.
163. **Ferket P., Parks C. and Grimes J.** (2002). Benefits of dietary antibiotics and mannanoligosaccharide supplementation for poultry. *Multi-state Poultry Meeting*. Atlanta, Georgia, USA.
164. **Ficken M. and Berkhoff H.** (1989). Clostridial infections. Purchase H., Arp L., Domermuth C. and Pearson J. (Eds). *Isolation and identification of avian pathogens*. 47-51 p., American Association of Avian Pathologists: Kennett Square, PA.
165. **Ficken M. and Wages D.** (1997). Necrotic enteritis. Calnek B. (Ed). *Diseases of poultry*. 10<sup>th</sup> Edition. 261-264 p., Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA.
166. **Fink-Gremmels J.** (2005). Mycotoxicosis in animal health european mycotoxin seminar series. 19-41 p., Publication of Alltech Incorporated, Nicholasville, USA.
167. **Frame D. and Bickford A.** (1986). An outbreak of coccidiosis and necrotic enteritis in 16-week-old cage-reared layer replacement pullets. *Avian Diseases*. **30**: 601-602.
168. **Franco-Jimenez D. and Beck M.** (2007). Physiological changes to transient exposure to heat stress observed in laying hens. *Poultry Science*. **86**: 538-544.
169. **Frankenhuis M., Vertommen M. and Hemminga H.** (1991). Influence of claw clipping, stocking density and feeding space on the incidence of scabby hips in broilers. *British Poultry Science*. **32**: 227-230.
170. **Freter R.** (1954). The fatal enteric cholera infection in the guinea pig. *Bacteriol. Proc.*: **56**.
171. **Freter R.** (1955). The fatal enteric cholera infection in the guinea pig achieved by inhibition of normal enteric flora. *Journal of Infectious Disease*. **97**: 57-64.
172. **Frey J. and Vileie M.** (2003). Molecular genetics of *Clostridium perfringens* toxins. *European Concerted Action QLK2-CT2001-01267. Protein toxins of the genus Clostridium and vaccination*. 45-51 p. Liege, Belgium.

173. **Fukata T., Hadate Y., Baba E., Uemura T. and Arakawa A.** (1988). Influence of *Clostridium perfringens* and its toxin in germ-free chickens. *Research in Veterinary Science*. **44**: 68-70.
174. **Gabriel I., Lessire M., Mallet S. and Guillot J.** (2006). Microflora of the digestive tract: critical factors and consequences for poultry. *World's Poultry Science Journal*. **62**: 499-508.
175. **Gadbois P., Brennan J., Bruce H., Wilson J. And Aramini J.** (2008). The role of penicillin G potassium in managing *Clostridium perfringens* in broiler chickens. *Avian Diseases*. **52**: 407-411.
176. **Gadzinski P. and Julian R.** (1992). Necrotic enteritis in turkeys. *Avian Diseases*. **36**: 792-798.
177. **Garner J., Falcone C., Wakenell P., Martin M. and Mench J.** (2002). Reliability and validity of a modified gait scoring system and its use in assessing tibial dyschondroplasia in broilers. *British Poultry Science*. **43**: 355-363.
178. **Garrido M., Skjervheim M., Oppegaard H. and Sorum H.** (2004). Acidified litter benefits the intestinal flora balance of broiler chickens *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 5208-5213.
179. **Garriga C., Hunter R., Amat C., Planas, J., Mitchell M. and Moret6 M.** (2006). Heat stress increases apical glucose transport in the chicken jejunum. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. **290**: 195-201.
180. **Gaskins H.** (2001). Intestinal bacteria and their influence on swine growth. Lewis A. and Southern L. (Eds). *Swine Nutrition*. 2<sup>nd</sup> Edition. 585-608 p., CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
181. **Gaskins H., Collier C. and Anderson D.** (2002). Antibiotics as growth promotants: Mode of action. *Animal Biotechnology*. **13**: 29-42.
182. **Gatsos X.** (2007). The development of live vectored vaccines targeting the alpha-toxin of *Clostridium perfringens* for the prevention of necrotic enteritis in poultry. *PhD thesis*. Biotechnology and Environmental Biology School of Applied Science, RMIT University, Melbourne, Victoria, Australia.
183. **Gholamiandekhordi A., Timbermont L., Lanckriet A., Van Den Broeck W., Pedersen K., Dewulf J., Pasmans F., Haesebrouck F., Ducatelle R. and Van Immerseel F.** (2007). Quantification of gut lesions in a subclinical necrotic enteritis model. *Avian Pathology*. **36**: 375-382.
184. **Gholamiandekhordi A., Ducatelle R., Heyndrickx M., Haesebrouck F. and Van Immerseel F.** (2006). Molecular and phenotypical characterization of *Clostridium perfringens* isolates from poultry flocks with different disease status. *Veterinary Microbiology*. **113**: 143-152.
185. **Gibson G. and Roberfroid M.** (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*. **125**: 1401-1412.
186. **Gilbert C. and Slavik M.** (2004). Determination of toxicity of *Campylobacter jejuni* isolated from humans and from poultry carcasses acquired at various stages of production. *Journal of Applied Microbiology*. **97**: 347-353.
187. **Gisolfi C.** (2000). Is the GI system built for exercise? *News in Physiological Sciences*. **15**: 114-119.
188. **Goddeeris B., Boersma W., Cox E., Van der Stede Y., Koenen M., Vancaeneghem S., Mast J. and Wan den Broeck W.** (2002). The porcine and avian intestinal immune system and its nutritional modulation. Blok M., Vahl H., Lange L., Braak A., Hemke g. and Hessing M. (Eds). *Nutrition and health of the gastrointestinal tract*. 97-134 p., Wageningen Academic Publishers, The Netherlands.
189. **Gohl B. and Gohl I.** (1977). The effect of viscous substances on the transit time of barley digesta in rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **28**: 911-915.

190. **Gong J., Forster R., Yu H., Chambers J., Wheatcroft R., Sabour P. and Chen S.** (2002). Molecular analysis of bacterial populations in the ileum of broiler chickens and comparison with bacteria in the cecum. *FEMS Microbiology Ecology*. **41**: 171-179.
191. **Gonzales E., Buyse J., Loddi M., Takita T., Buys N. and Decuypere E.** (1998). Performance, incidence of metabolic disturbances and endocrine variables of food-restricted male broiler chickens. *British Poultry Science*. **39**: 671-678.
192. **Gordon R. and Roland D.** (1997). The influence of environmental temperature on in vivo limestone solubilization, feed passage rate, and gastrointestinal pH in laying hens. *Poultry Science*. **76**: 683-688.
193. **Gordon R. and Roland D.** (1998). Influence of supplemental phytase on calcium and phosphorus utilization in laying hens. *Poultry Science*. **77**: 290-294.
194. **Grant G.** (1982). Avian incubation: Egg temperature, nest humidity and behavioral thermoregulation in a hot environment. *Ornithological Monographs*. **30**: 1-75.
195. **Grave K., Kaldhusdal M., Kruse H., Fevang R., Harr L. and Flatlandsmo K.** (2004). What has happened in Norway after the ban of Avoparcin? Consumption of antimicrobials by poultry. *Preventative Veterinary Medicine*. **62**: 59-72.
196. **Grizzle J., Iheanacho M., Saxton A. and Broaden J.** (1992). Nutritional and environmental factors involved in egg shell quality of laying hens. *British Poultry Science*. **33**: 781-794.
197. **Gross W. and Siegel P.** (1988). Environment-genetic influences on immunocompetence. *Journal of Animal Science*. **66**: 2091-2094.
198. **Guzman V., Silva D. and Keo U.** (2003). A comparison between IgG antibodies against *Eimeria acervulina*, *E. maxima*, and *E. tenella* and oocyst shedding in broiler-breeders vaccinated with live anticoccidial vaccines. *Vaccine*. **21**: 4225-4233.
199. **Hagen C. and Bildfell R.** (2007). An observation of *Clostridium perfringens* in Greater Sage-Grouse. *Journal of Wildlife Diseases* **43**: 545-547.
200. **Hall A.** (2001). The effect of stocking density on the welfare and behaviour of broiler chickens reared commercially. *Animal Welfare*. **10**: 23-40.
201. **Hall D., Baumgardner K., Oberley T. and Gisolfi C.** (1999). Splanchnic tissues undergo hypoxic stress during whole body hyperthermia. *American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology*. **276**: 1195-1203.
202. **Hamdy A., Thomas R., Yancey R. and Davis R.** (1983). Therapeutic effect of optimal lincomycin concentration in drinking water on necrotic enteritis in broilers. *Poultry Science*. **62**: 589-591.
203. **Hammond D.** (1973). Life cycles and development of coccidia. Hammond D. and Long P. (Eds). *The Coccidia: Eimeria, Isospora, and Related Genera*. 45-79 p., University Park Press, Baltimore, USA.
204. **Han T., Leone E., Estevez I. and Humphrey B.** (2005). Effect of group size and housing density on behavior and stress responses in broilers. *Poultry Science*. **79** (Suppl. 1): 2.
205. **Hangalapura B.** (2006). Cold stress and immunity: Do chickens adapt to cold by trading-off immunity for thermoregulation? *PhD Thesis*. Wageningen Institute of Animal Sciences, Wageningen University and Research Centre, The Netherlands.

206. **Hangalapura B., Kaiser M., Vanderpoel J., Parmentier H. and Lamont S.** (2006). Cold stress equally enhances in vivo pro-inflammatory cytokine gene expression in chicken line divergently selected for antibody responses. *Developmental and Comparative Immunology*. **30**: 503-511.
207. **Hangalapura B., Nieuwland G., Buyse J., Kemp B. and Parmentier H.** (2004α). Effect of duration of cold stress on plasma adrenal and thyroid hormone levels and immune responses in chicken lines divergently selected for antibody responses. *Poultry Science*. **83**:1644-1649.
208. **Hangalapura B., Nieuwland M., De Vries Reilingh G., Heetkamp M., Van Den Brand H., Kemp B. and Parmentier H.** (2003). Effects of cold stress on immune responses and body weight of chicken lines divergently selected for antibody responses to sheep red blood cells. *Poultry Science*. **82**: 1692-1700.
209. **Hangalapura B., Nieuwland M., De Vries Reilingh G., Van Den Brand H., Kemp B. and Parmentier H.** (2004β). Durations of cold stress modulates overall immunity of chicken lines divergently selected for antibody responses. *Poultry Science*. **83**: 765-775.
210. **Hansen R. and Becker W.** (1960). Feeding space, population density and growth of young chickens. *Poultry Science*. **39**: 654-661.
211. **Haralampu S.** (2000). Resistant starch – a review of the physical properties and biological impact of RS3. *Carbohydrate Polymers*. **41**: 285-292.
212. **Hatheway C.** (1990). Toxigenic clostridia. *Clinical Microbiology Revision*. **3**: 66-98.
213. **Havenstein G., Ferket P., Scheideler S. and Larson B.** (1994). Growth, liveability, and feed conversion of 1957 vs. 1991 broilers when fed Typical 1957 and 1991 broiler diets. *Poultry Science*. **73**: 1785-1794.
214. **Heckert R., Estevez I., Russek-Cohen E. and Pettit-Riley R.** (2002). Effects of density and perch availability on the immune status of broilers. *Poultry Science*. **81**: 451-457.
215. **Heier B., Lovland A., Soleim K., Kaldhusdal M. and Jarp J.** (2001). A field study of naturally occurring specific antibodies against *Clostridium perfringens* a toxin in Norwegian broiler flocks. *Avian Diseases*. **45**: 724-732.
216. **Heishman J., Cunningham C. and Clark T.** (1952). Floor space requirement of broilers. *Poultry Science*. **31**:920.
217. **Helmholtz C. and Bryant E.** (1971). The pathology of necrotic enteritis in domestic fowl. *Avian Diseases*. **15**: 775-780.
218. **Hermans P. and Morgan K.** (2007). Prevalence and associated risk factors of necrotic enteritis on broiler farms in the United Kingdom; a cross-sectional survey. *Avian Pathology*. **36**: 43-51.
219. **Hester P., Muir W. and Craig J.** (1996). Group selection for adaptation to multiple hen cages: humoral immune response. *Poultry Science*. **75**: 1315-1320.
220. **Hetland H., Choct M. and Svihus S.** (2004). Role of insoluble non-starch polysaccharides in poultry nutrition. *World's Poultry Science Journal*. **60**: 415-422.
221. **Hinton A., Buhr R. and Ingram K.** (2000). Physical, chemical, and microbiological changes in the caeca of broiler chickens subjected to incremental feed withdrawal. *Poultry Science*. **79**: 483-488.
222. **Hocking P., Gilbert A., Walker M. and Waddington D.** (1987). Ovarian follicular structure of White leghorns fed *ad libitum* and dwarf and normal birds fed *ad libitum* or restricted to point of lay. *British Poultry Science*. **28**: 493-506.



223. **Hocking P., Maxwell M. and Mitchell M.** (1993). Welfare assessment of broiler breeder and layer females subjected to food restriction and limited access to water during rearing. *British Poultry Science*. **34**: 443-458.
224. **Hocking P., Maxwell M. and Mitchell M.** (1994). Hematology and blood composition at 2 ambient-temperatures in genetically fat and lean adult broiler breeder females fed *ad libitum* or restricted throughout life. *British Poultry Science*. **35**: 799-807.
225. **Hocking P., Waddington M., Walker M. and Gilbert A.** (1989). Control of the development of the follicular hierarchy in broiler breeder pullets by food restriction during rearing. *British Poultry Science*. **30**: 161-174.
226. **Hoerr F.** (2003). Mycotoxicoses. Saif Y., Barnes H., Glisson J., Fadly A., McDougald L. and Swayne D. (Eds.). *Diseases of Poultry* 11<sup>th</sup> Edition. 1103-1132 p., Iowa State Press. Blackwell Publishing Company. Iowa, USA.
227. **Hofacre C., Beacorn C., Collett S. and Mathis G.** (2003). Using competitive exclusion, mannan-oligosaccharide and other intestinal products to control necrotic enteritis. *Journal of Applied Poultry Research*. **12**: 60-64.
228. **Hofacre C., Froyman R., Gautrias B., George B., Goodwin M. and Brown J.** (1998). Use of Aviguard and other intestinal bioproducts in experimental *Clostridium perfringens*-associated necrotizing enteritis in broiler chickens. *Avian Diseases*. **42**: 579-584.
229. **Hofshagen M. and Kaldhusdal M.** (1992). Barley inclusion and avoparcin supplementation in broiler diets. 1. Effect on small intestinal bacterial flora and performance. *Poultry Science*. **71**: 959-969.
230. **Holt P.** (2003). Molting and *Salmonella enterica* serovar enteritidis infection: the problem and some solutions. *Poultry Science*. **82**: 1008-1010.
231. **Hong H., Duc le H. and Cutting S.** (2005). The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiology Revision*. **29**: 813-835.
232. **Hook D., Jalaludin B. and Fitzsimmons G.** (1996). *Clostridium perfringens* food-borne-outbreak: an epidemiological investigation. *Australian and New Zealand Journal of Public Health*. **20**: 119-122.
233. **Hooper L., Wong M., Thelin A., Hansson L., Falk P. and Gordon J.** (2001). Molecular analysis of commensal host microbial relationships of the intestine. *Science*. **291**: 881-884.
234. **Hopwood D., Pethick D., Pluske J. and Hampson D.** (2004). Addition of pearl barley to a rice-based diet for newly weaned piglets increases the viscosity of the intestinal contents, reduces starch digestibility and exacerbates post-weaning colibacillosis. *British Journal of Nutrition*. **92**: 419-427.
235. **Huff G., Huff W., Rath N., Solis de los Santos F., Farnell B. and Donoghue A.** (2007). Influence of hen age on the response of turkey poult to cold stress, *Escherichia coli* challenge, and treatment with a yeast extract antibiotic alternative. *Poultry Science*. **86**: 636-642.
236. **Hughes L., Hermans P. and Morgan K.** (2008). Risk factors for the use of prescription antibiotics on UK broiler farms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **61**: 947-952.
237. **Hurwitz S., Weiselberg M., Eisner U., Bartov I., Riesenfeld G., Sharvit M., Niv A. and Bornstein S.** (1980). The energy requirements and performance of growing chickens and turkeys as affected by environmental temperature. *Poultry Science*. **59**: 2290-2299.

238. **Hutchison T. and Riddell C.** (1990). A study of hepatic lesions in broiler chickens at processing plants in Saskatchewan. *Canadian Veterinary Journal*. **31**: 20-25.
239. **Iji, P. and Tivey D.** (1998). Natural and synthetic oligosaccharides in broiler chicken diets. *World's Poultry Science Journal*. **54**: 129-143.
240. **Immerseel F., De Buck J., Pasmans F., Huyghebaert G., Haesebrouck F. and Ducatelle R.** (2004). *Clostridium perfringens* in poultry: An emerging threat for animal and public health. *Avian Pathology*. **33**: 537-549.
241. **Immerseel F., Rood J., Moore R. and Titball R.** (2009). Rethinking our understanding of the pathogenesis of necrotic enteritis in chickens. *Trends in Microbiology*. **17**: 32-36.
242. **Inbarr J.** (2001). Swedish poultry production without in-feed antibiotics – an opportunity for Clostridia. *British Poultry Science*. **42**: S64-S65.
243. **Ispolatovskaya M.** (1971). Type A *Clostridium perfringens* toxin. Academic Press, NY.
244. **Jackson M., Anderson D., Hsiao H., Mathis G. and Fodge D.** (2003). Beneficial effect of beta-mannanase feed enzyme on performance of chicks challenged with *Eimeria* spp. and *Clostridium perfringens*. *Avian Diseases*. **47**: 759-763.
245. **Jansman A., Van der Klis J. and Fabri T.** (2003). A model to study necrotic enteritis in broilers. 14<sup>th</sup> *European Symposium on Poultry Nutrition*. 158-159 p., Lillehammer, Norway.
246. **Jeffers T.** (1975). Attenuation of *Eimeria tenella* through selection for precociousness. *Journal of Parasitology*. **61**: 1083-1090.
247. **Jeffers T.** (1976). Reduction of anticoccidial drug resistance by massive introduction of drug sensitive coccidia. *Avian Diseases*. **20**: 649-653.
248. **Jenkins M., Augustine P., Danforth H., Seferian P. and Barta J.** (1993). *Eimeria* oocysts exposed to gamma irradiation induce protective immunity in the absence of merogony relevance to vaccine development. *Proceedings 6<sup>th</sup> International Coccidiosis Conference*. 112-117 p., Guelph, University of Guelph, Canada.
249. **Jensen L., Merrill L., Reddy C. and McGinnis J.** (1962). Observations on eating patterns and rate of food passage of birds fed pelleted and unpelleted diets. *Poultry Science*. **41**: 1414-1419.
250. **Jeurissen S., Lewis F., van der Klis J., Mroz Z., Rebel J. and Huurne A.** (2002). Parameters and techniques to determine intestinal health of poultry as constituted by immunity, integrity, and functionality. *Current Issues in Intestinal Microbiology*. **3**: 1-14.
251. **Jia W., Slominski B., Bruce H., Blank G., Crow G. and Jones O.** (2009). Effects of diet type and enzyme addition on growth performance and gut health of broiler chickens during subclinical *Clostridium perfringens* challenge. *Poultry Science* **88**: 132-140.
252. **Johansen C., Bjerrum L. and Pedersen K.** (2007). Impact of salinomycin on the intestinal microflora of broiler chickens. *Acta veterinaria scandinavica* **49**: 30.
253. **Johansson A.** (2006). *Clostridium perfringens*: the causal agent of necrotic enteritis in poultry. *PhD thesis*, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.
254. **Johansson A., Greko C., Engstrom B. and Karlsson M.** (2004). Antimicrobial, susceptibility of Swedish, Norwegian and Danish isolates of *Clostridium perfringens* from poultry and distribution of tetracycline resistance genes. *Veterinary Microbiology*. **99**: 251-257.

255. **Johnson C.** (1989). *Clostridium perfringens* food poisoning. Finegold S. and George W. (Eds). *Anaerobic infections in humans*. 629-638 p., Academic Press. London, UK.
256. **Johnson J. and Reid W.** (1970). Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. *Experimental Parasitology*. **28**: 30-36.
257. **Johnson R.** (1998). Immune and endocrine regulation of food intake in sick animals. *Domestic Animal Endocrinology*. **15**: 309-319.
258. **Jones E., Zaczek V., MacLeod M. and Hocking P.** (2004). Genotype, dietary manipulation and food allocation affect indices of welfare in broiler breeders. *British Poultry Science*. **45**: 725-737.
259. **Jones F., Anderson K. and Ferket P.** (1995). Effect of extrusion on feed characteristics and broiler chicken performance. *Journal of Applied Poultry Research*. **4**: 300-309.
260. **Jones T., Donnelly C. and Dawkins M.** (2005). Environmental and management factors affecting the welfare of chickens on commercial farms in the United Kingdom and Denmark stocked at five densities. *Poultry Science* **84**: 1155-1165.
261. **Joyner L. and Norton C.** (1973). The immunity arising from continuous low-level infection with *Eimeria tenella*. *Parasitology*. **67**: 333-340.
262. **Julian R.** (1993). Ascites in poultry. *Avian Pathology*. **22**: 419-454.
263. **Julian R.** (1996). Cardiovascular disease. Jordan F. and Pattison M. (Eds.). *Poultry Diseases* 4<sup>th</sup> Edition. 365 p., Saunders. London, UK.
264. **Julian R.** (1997). Causes and prevention of ascites in broilers. *Zootecnica International*. **4**: 52-53.
265. **Julian R.** (1998). Rapid growth problems: ascites and skeletal deformities in broilers. *Poultry Science*. **77**: 1773-1780.
266. **Juskiewicz J., Zdunczyk Z. and Jankowski J.** (2004). Selected parameters of gastrointestinal tract metabolism of turkeys fed diets with flavomycin and different inulin content. *World's Poultry Science Journal*. **60**: 177-185.
267. **Kadymov R. and Aleskerov Z.** (1988). Immunological reactivity of poultry organism under high temperature conditions. *Soviet agriculture sciences*. **5**: 33-35.
268. **Kaldhusdal M.** (2000). Necrotic enteritis as affected by dietary ingredients. *World Poultry*. **16**: 42-43.
269. **Kaldhusdal M. and Hofshagen M.** (1992). Barley inclusion and avoparcin supplementation in broiler diets. 2. Clinical, pathological, and bacteriological findings in a mild form of necrotic enteritis. *Poultry Science*. **71**: 1145-1153.
270. **Kaldhusdal M. and Lovland A.** (2000). The economic impact of *Clostridium perfringens* is greater than anticipated. *World Poultry*. **16**: 50-51.
271. **Kaldhusdal M. and Skjerve E.** (1996). Association between cereal contents in the diet and incidence of necrotic enteritis in broiler chickens in Norway. *Preventive Veterinary Medicine*. **28**: 1-16.
272. **Kaldhusdal M., Evensen O. and Landsverk T.** (1995). *Clostridium perfringens* necrotizing enteritis of the fowl: A light microscopic, immunohistochemical and ultrastructural study of spontaneous disease. *Avian Pathology*. **24**: 421-433.
273. **Kaldhusdal M., Hofshagen M., Lovland A., Langstrand H. and Redhead K.** (1999). Necrotic enteritis challenge models with broiler chickens raised on litter: Evaluation of preconditions, *Clostridium perfringens* strains and outcome variables. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. **24**: 337-343.

274. **Kaldhusdal M., Schneitz C., Hofshagen M. and Skjerve E.** (2001). Reduced incidence of *Clostridium perfringens*-associated lesions and improved performance in broiler chickens treated with normal intestinal bacteria from adult fowl. *Avian Diseases*. **45**: 149-156.
275. **Karaca A., Parker H., Yeatman J. and McDaniel C.** (2002). The effects of heat stress and sperm quality classification on broiler breeder male fertility and semen ion concentrations. *British Poultry Science*. **44**: 621-628.
276. **Kelly D., Campbell J., King T., Grant G., Jansson E., Coutts A., Pettersson S. and Conway S.** (2004). Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA. *Nature Immunology*. **5**: 104-112.
277. **Kessel A., Gillespie I., O'Brien S., Adak G., Humphrey T. and Ward L.** (2001). General outbreaks of infectious intestinal diseases linked with poultry, England and Wales, 1992 -1999. *Communicable Disease and Public Health*. **4**: 171-177.
278. **Kestin S., Knowles T., Tinch A. and Gregory N.** (1992). The prevalence of leg weakness in broiler chickens and its relationship with genotype. *The Veterinary Record*. **131**: 190-194.
279. **Kettlewell P., Mitchell M. and Meehan A.** (1993). The distribution of thermal loads within poultry transport vehicles. *Journal of Agricultural Engineering Research*. **48**: 26-30.
280. **Keyburn A., Boyce J., Vaz P., Bannam T., Ford M. and Parker D., Rubbo A., Rood J. and Moore R.** (2008). NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathogen*. **4**: e26.
281. **Keyburn A., Sheedy S., Ford M., Williamson M., Awad M., Rood J. and Moore R.** (2006). Alpha-toxin of *Clostridium perfringens* is not an essential virulence factor in necrotic enteritis in chickens. *Infection and Immunity*. **74**: 6496-6500.
282. **Kheysin Y.** (1972). Life cycles of coccidia of domestic animals. William Heinemann Medical Books. London, UK.
283. **Kitandu A. and Juranova R.** (2006). Progress in control measures for chicken coccidiosis. *Acta Veterinaria Brno*. **75**: 265-276.
284. **Klasing K.** (1988). Influence of acute feed deprivation or excess feed intake on immune competence of broiler chickens. *Poultry Science*. **67**: 626-631.
285. **Klasing K.** (1998). Nutritional modulation of resistance to infectious diseases. *Poultry Science*. **77**: 1119-1125.
286. **Klasing K., Laurin D., Peng R. and Fry D.** (1987). Immunologically mediated growth depression in chicks: influence of feed intake, corticosterone and interleukin-1. *The Journal of Nutrition*. **117**: 1629-37.
287. **Kleessen B., Hartmann L. and Blaut M.** (2003). Fructans in the diet cause alterations of intestinal mucosal architecture, released mucins and mucosa-associated bifidobacteria in gnotobiotic rats. *British Journal of Nutrition*. **89**: 597-606.
288. **Knarreborg A., Simon M., Engberg R., Jensen B. and Tannock G.** (2002). Effects of dietary fat source and subtherapeutic levels of antibiotic on the bacterial community in the ileum of broiler chickens at various ages. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**: 5918-5924.
289. **Kocher A.** (2003). Nutritional manipulation of necrotic enteritis outbreak in broilers. *Recent Advances in Animal Nutrition in Australia*. **14**: 111-116.

290. **Kocher A. and Chost M.** (2008). Improving broiler chicken performance: The efficacy of organic acids, prebiotics and enzymes in controlling necrotic enteritis. RIRDC publication No 08/149. RIRDC project No UNE- 75A. Australia.
291. **Koehler B., Vogel K. and Starost P.** (1977). Necrotic and ulcerative enteritis in fattening and laying fowls under conditions of intensive poultry production. *Monatshefte fur Veterinarmedizin*. **32**: 704-711.
292. **Koelkebeck K. and Odom T.** (1994). Laying hens responses to acute heat stress and carbon dioxide supplementation: I. Blood gas changes and plasma lactate accumulation. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **107A**: 603-606.
293. **Koutsos E. and Arias V.** (2006). Intestinal ecology: interactions among the gastrointestinal tract, nutrition and the microflora. *Journal of Applied Poultry Research*. **15**: 161-173.
294. **Kraehenbuhl J. and Neutra M.** (1992). Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces. *Physiology Reviews*. **72**: 853-879.
295. **Kregel K., Wall P. and Gisolfi C.** (1988). Peripheral vascular responses to hyperthermia in the rat. *Journal of applied Physiology*. **64**: 2582-2588.
296. **Krieg N.** (1984). Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 1. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
297. **Kulkarni R., Parreira V., Sharif S. and Prescott J.** (2007). Immunization of broiler chickens against *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis. *Clinical and Vaccine Immunology*. **14**:1070-1077.
298. **Kulkarni R., Parreira V., Sharif S. and Prescott J.** (2008). Oral immunization of broiler chickens against necrotic enteritis with an attenuated Salmonella vaccine vector expressing *Clostridium perfringens* antigens. *Vaccine*. **26**: 4194-4203.
299. **Kwon Y., Lee Y. and Mo I.** (2004). An outbreak of necrotic enteritis in the ostrich farm in Korea. *Journal of Veterinary Medical Science*. **66**: 1613-1615.
300. **La Ragione R. and Woodward M.** (2003). Competitive exclusion by *Bacillus subtilis* spores of *Salmonella enterica* serotype enteritidis and *Clostridium perfringens* in young chickens. *Veterinary Microbiology*. **94**: 245-256.
301. **Labbe' R.** (2000). *Clostridium perfringens*. Lund B., T. Baird- Parker and Gould G. (Eds). *The Microbiological Safety and Quality of Food*. 1110-1135 p., Aspen Publishers. Gaithersburg, Maryland, USA.
302. **Lambert G., Gisolfi C., Berg D., Moseley P., Oberley L. and Kregel K.** (2002). Molecular Biology of Thermoregulation Selected Contribution: Hyperthermia-induced intestinal permeability and the role of oxidative and nitrosative stress. *Journal of Applied Physiology*. **92**: 1750-1761.
303. **Lan Y., Verstegen M., Tamminga S. and Williams B.** (2005). The role of the commensal gut microbial community in broiler chickens. *World's Poultry Science Journal*. **61**: 95-104.
304. **Langhout D., Schutte J., de Jong J., Sloetjes H., Verstegen M. and Tamminga S.** (2000). Effect of viscosity on digestion of nutrients in conventional and germ-free chicks. *British Journal of Nutrition*. **83**: 533-540.
305. **Lee J.** (2006). Influence of dietary composition on coccidiosis vaccination efficacy in broilers. *PhD thesis*. A&M University of Texas, Texas, USA.

306. **Lee K. and Leeson S.** (2001). Performance of broilers fed limited quantities of feed or nutrients during seven to fourteen days of age. *Poultry Science* **80**: 446-454.
307. **Leeson S. and Summers J.** (1997). Feeding programs for broilers. *Commercial Poultry Nutrition*. 2<sup>nd</sup> Edition. 207-254 p., University Books, Guelph, Canada.
308. **Leeson S. and Zubair A.** (1997). Nutrition of the broiler chicken around the period of compensatory growth. *Poultry Science*. **76**: 992-999.
309. **Leeson S., Summers J. and Caston L.** (1991). Diet dilution and compensatory growth in broilers. *Poultry Science*. **70**: 867-873.
310. **Leeson S., Summers J. and Caston L.** (1992). Response of broilers to feed restriction or diet dilution in the finisher period. *Poultry Science*. **71**: 2056-2064.
311. **Leili S., Buonomo F. and Scanes C.** (1997). The effects of dietary restriction on Insulin-like growth factor (IGF)-1 and II, and IGF-binding proteins in chickens. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. **216**: 104-111.
312. **Levine N.** (1970). Taxonomy of the coccidia. *Journal of Parasitology*. **56**: 208-209.
313. **Levine P.** (1939). The effect of sulfanilamide on the course of experimental avian coccidiosis. *Cornell Vet.* **29**: 309-320.
314. **Li K., Xiao S. and Xiang F.** (2005). Responses of chickens vaccinated with a live attenuated multi-valent ionophore tolerant *Eimeria* vaccine. *Veterinary Parasitology*. **129**: 179-186.
315. **Lillehoj H.** (1998): Role of T lymphocytes and cytokines in coccidiosis. *International Journal of Parasitology*. **28**: 1071-1081.
316. **Lillehoj H. and Lillehoj E.** (2000). Avian coccidiosis. A review of acquired intestinal immunity and vaccination strategies. *Avian Diseases*. **44**: 408-425.
317. **Lindquist S. and Craig E.** (1988). The heat-shock proteins. *Annual Review of Genetics*. **22**: 631-677.
318. **Long J.** (1973 $\alpha$ ). Necrotic enteritis in broiler chickens. I. A review of the literature and the prevalence of the disease in Ontario. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. **37**: 302-308.
319. **Long J. and Truscott R.** (1976). Necrotic enteritis in broiler chickens. III. Reproduction of the disease. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. **40**: 53-59.
320. **Long J., Pettit J. and Barnum D.** (1974). Necrotic enteritis in broiler chickens. II. Pathology and proposed pathogenesis. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. **38**: 467-474.
321. **Long P.** (1965). Development of *Eimeria tenella* in avian embryos. *Nature*. **208**: 509-510.
322. **Long P.** (1968). The pathogenic effects of *Eimeria praecox* and *E. acervulina* in the chicken. *Parasitology* **58**: 691-700.
323. **Long P.** (1972). *Eimeria tenella*: reproduction, pathogenicity and immunogenicity of a strain maintained in chick embryos by serial passage. *Journal of Comparative Pathology*. **82**: 429-437.
324. **Long P.** (1973 $\beta$ ). Endogenous stages of a "chick embryo-adapted" strain of *Eimeria tenella*. *Parasitology*. **66**: 55-62.
325. **Long P. and Reid W.** (1982). A guide for the diagnosis of coccidiosis in chickens. *University of Georgia, College of Agriculture, Research Reports*. **404**: 1-17.

326. Long P., Johnson J., McKenzie M., Perry E., Crane M. and Murray P. (1986). Immunisation of young broiler chickens with low level infections of *Eimeria tenella*, *E. acervulina* or *E. maxima*. *Avian Pathology*. **15**: 271-278.
327. Lovanh N., Cook K., Rothrock M., Miles D. and Sistani K. (2007). Spatial shifts in microbial population structure within poultry litter associated with physicochemical properties. *Poultry Science*. **86**: 1840-1849.
328. Lovland A. and Kaldhusdal M. (1999). Liver lesions seen at slaughter as an indicator of necrotic enteritis in broiler flocks. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. **24**: 345-351.
329. Lovland A. and Kaldhusdal M. (2001). Severely impaired production performance in broiler flocks with high incidence of *Clostridium perfringens*-associated hepatitis. *Avian Pathology*. **30**: 73-81.
330. Lovland A., Kaldhusdal M. and Reitan L. (2003). Diagnosing *Clostridium perfringens* associated necrotic enteritis in broiler flocks by an immunoglobulin G antialpha-toxin enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Pathology*. **32**: 527-534.
331. Lovland A., Kaldhusdal M., Redhead K., Skjerve E. and Lillehaug A. (2004). Maternal vaccination against subclinical necrotic enteritis in broilers. *Avian Pathology*. **33**: 83-92.
332. Lu J., Hofacre C., Smith F. and Lee M. (2008). Effects of feed additives on the development on the ileal bacterial community of the broiler chicken. *Animal*. **2**: 669-676.
333. Lu J., Idris U., Harmon B., Hofacre C., Maurer J. and Lee M. (2003). Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**: 6816-6824.
334. Lucey B. and Hutchins G. (2004). William H. Welch, MD, and the discovery of *Bacillus welchii*. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. **128**: 1193-1195.
335. Lyras D. and Rood J. (1996). Genetic organization and distribution of tetracycline resistance determinants in *Clostridium perfringens*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **40**: 2500-2504.
336. Madden K. and Felten D. (1995). Experimental basis for neural-immune interactions. *Physiological Reviews*. **75**: 77-106.
337. Madhusudhan K., Ramesh J., Ogawua T., Sasaoka K. and Singh N. (1986). Detoxification of commercial linseed meal for use in broiler rations. *Poultry Science*. **65**: 164-171.
338. Mahmoud K., Beck M., Scheideler S., Forman M., Anderson K. and Kachman S. (1996). Acute high environmental temperature and calcium-estrogen relationships in the hen. *Poultry Science*. **75**: 1555-1562.
339. Malone G., Chaloupka G., Merkley J. and Littlefield L. (1980). The effects of feeder space and light treatment on broiler performance. *Poultry Science*. **59**: 2697-2702.
340. Marsh R. and Dawson W. (1989). Avian adjustments to cold. Wang L. (Ed.). *Advances in Comparative and Environmental Physiology*. Vol. 4. 205-253 p., Springer-Verlag. Berlin, Germany.
341. Martel A., Devriese L., Cauwerts K., De Gussem K., Decostere A. and Haesebrouck F. (2004). Susceptibility of *Clostridium perfringens* strains from broiler chickens to antibiotics and anticoccidials. *Avian Pathology*. **33**: 3-7.
342. Martin A., Danforth H., Barta J. and Fernando M. (1997). Analysis of immunological cross-protection and sensitivities to anticoccidial drugs among five geographical and temporal strains of *Eimeria maxima*. *International Journal for Parasitology*. **27**: 527-533.

343. **Mashaly M., Hendricks G., Kalama M., Gehad A., Abbas A. and Patterson P.** (2004). Effect of heat stress on production parameters and immune responses of commercial laying hens. *Poultry Science*. **83**: 889-894.
344. **Mashaly M., Webb M., Yountz S., Roush W. and Graves H.** (1984). Changes in serum corticosterone concentration of laying hens as a response to increased population density. *Poultry Science*. **63**: 2271-2274.
345. **Mateos G., Lazaro R. and Gracia M.** (2002). The feasibility of using nutritional modifications to replace drugs in poultry feeds. *Journal of Applied Poultry Research*. **11**: 437-452.
346. **McCartney E.** (2002). The natural world strikes back. *Poultry International*. 36-42.
347. **McCourt M., Finlay D., Laird C., Smyth J., Bell C. and Ball H.** (2005). Sandwich ELISA detection of *Clostridium perfringens* cells and a-toxin from field cases of necrotic enteritis of poultry. *Veterinary Microbiology*. **106**: 259-264.
348. **McDaniel G., Brake J. and Bushlong R.** (1981). Factors affecting broiler performance. 1. Relationship of daily feed intake level to reproductive performance of pullets. *Poultry Science*. **60**: 307-312.
349. **McDevitt R., Brooker J., Acamovic T. and Sparks N.** (2006). Necrotic enteritis: a continuing challenge for the poultry industry. *World's Poultry Science Journal*. **62**: 221-247.
350. **McDevitt R., Brooker J., Acamovit T. and Sparks N.** (2005). The effect of non-starch polysaccharide inclusion in the diet on *Clostridium perfringens* in the gut of the broiler chicken. *British Poultry Abstracts*. **1**: 10-11
351. **McDougald L.** (1982). Chemotherapy of coccidiosis. Long P. (Ed.). *The Biology of the Coccidia*. 373-427 p., Edward Arnold Publishing. London. UK.
352. **McDougald L.** (2003). Coccidiosis. Saif Y., Barnes H., Glisson J., Fadly A., McDougald L. and Swayne D. (Eds), *Diseases of Poultry* 11<sup>th</sup> Edition. 974-991 p., Iowa State Press. Blackwell Publishing Company. Iowa, USA.
353. **McDougald L. and Hu J.** (2001). Blackhead disease (*Histomonas meleagridis*) aggravated in broiler chickens by concurrent infection with caecal coccidiosis (*Eimeria tenella*). *Avian Diseases*. **45**: 307-312.
354. **McDougald L., Fuller A. and McMurray B.** (1997). A survey of coccidia on 43 poultry farms in Argentina. *Avian Diseases*. **41**: 485-487.
355. **McDougald L., Mathis G. and Conway D.** (1996). Effects on semudaramicin, salinomycin, and monensin on performance, shank pigmentation, and coccidial lesions in broiler chickens in floor pens. *Avian Diseases*. **40**: 68-71.
356. **McEvoy J.** (2001). Safe limits for veterinary drug residues: what do they mean? *Northern Ireland Veterinary Today*. **Spring**: 37-40.
357. **McPherson A., Gatto D., Sainsbury E., Harriman G., Hengartner H. and Zinkernagel R.** (2000). A primitive T cell independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal intestinal bacteria. *Science*. **288**: 2222-2226.
358. **McReynolds J., Byrd J., Anderson R., Moore R., Edrington T., Genovese K., Poole T., Kubena L. and Nisbet D.** (2004). Evaluation of immunosuppressants and dietary mechanisms in an experimental disease model for necrotic enteritis. *Poultry Science*. **83**: 1948-1952.
359. **McReynolds J., Byrd J., Genovese K., Poole T., Duke S., Farnell M. and Nisbet D.** (2007). Dietary lactose and its effect on the disease condition of necrotic enteritis. *Poultry Science*. **86**: 1656-1661.



360. **Mitchell M. and Carlisle A.** (1992). The effect of chronic exposure to elevated environmental temperature on intestinal morphology and nutrient absorption in the domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. **101A**: 137-142.
361. **Mitchell M. and Kettlewell P.** (1993). Catching and transport of broiler chickens. Savory C. and Hughes B. (Eds). *Proceedings of the 4<sup>th</sup> European Symposium on Poultry Welfare*. 219-229 p., Universities Federation for Animal Welfare, Potters Bar, UK.
362. **Mitchell M. and Kettlewell P.** (1998). Physiological stress and welfare of broiler chickens in transit: solutions not problems! *Poultry Science* **77**: 1803-1814.
363. **Mitchell M., Kettlewell P. and Maxwell M.** (1992). Indicators of physiological stress in broiler chickens during road transportation. *Animal Welfare*. **1**: 91-103.
364. **Mitsch P., Zitterl-Eglseer K., Kohler B., Gabler C., Losa R. and Zimpernik I.** (2004). The effect of two different blends of essential oil components on the proliferation of *Clostridium perfringens* in the intestines of broiler chickens. *Poultry Science*. **83**: 669-675.
365. **Miwa N., Nishina T., Kubo S. and Atsumi M.** (1996). Most probable number method combined with nested polymerase chain reaction for detection and enumeration of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in intestinal contents of cattle, pig and chicken. *Journal of Veterinary Medical Science*. **59**: 89-92.
366. **Miwa N., Nishina T., Kubo S. and Honda H.** (1997). Most probable numbers of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in intestinal contents of domestic livestock detected by nested PCR. *Journal of Veterinary Medical Science*. **59**: 557-560.
367. **Miwa N., Nishina T., Kubo S., Atsumi M. and Honda H.** (1998). Amount of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in meat detected by nested PCR. *International Journal of Food Microbiology*. **42**: 195-200.
368. **Mollenhorst H., van Woudenberg C., Bokkers E. and de Boer I.** (2005). Risk factors for *Salmonella enteritidis* infections in laying hens. *Poultry Science*. **84**: 1308-1313.
369. **Morris T.** (1968). Light requirement of the fowl. Carter T. (Ed). *Environmental control in poultry production*. 15-39 p., Oliver and Boyd, Edinburgh, UK.
370. **Morrow C.** (2001). Solving the problems of necrotic enteritis. *British Poultry Science*. **42**: S65-S67.
371. **Mroz Z., Koopmans S., Bannink A., Partanen K., Krasucki W., Øverland Radcliffe S.** (2006). Carboxylic acids as bioregulators and gut growth promoters in nonruminants. Mosenthin R., Zentek J. and Zebrowska T. (Eds). *Biology of nutrition in growing animals*. Vol. 4. 81-134 p., Elsevier. London, UK.
372. **Mtileni B., Nephawe K., Nesamvuni A. and Benyi K.** (2007). The influence of stocking density on body weight, egg weight, and feed intake of adult broiler breeder hens. *Poultry Science*. **86**: 1615-1619.
373. **Muhammed S., Morrison S. and Boyd W.** (1975). Nutritional requirements for growth and sporulation of *Clostridium perfringens*. *Journal of Applied Bacteriology*. **38**: 245-253.
374. **Nairn M. and Bamford V.** (1967). Necrotic enteritis of broiler chickens in Western Australia. *Australian Veterinary Journal*. **43**: 49-54.
375. **National Chicken Council.** (2005). Animal welfare guidelines and audit checklist. *National Chicken Council*. Washington, DC.
376. **National Research Council.** (1994). Nutrient requirements of poultry. 9<sup>th</sup> Revised Edition. National Academy Press. Washington, USA.

377. **Nauerby B., Pedersen K. and Madsen M.** (2003). Analysis by pulsed-field gel electrophoresis of the genetic diversity among *Clostridium perfringens* isolates from chickens. *Veterinary Microbiology*. **94**: 257-266.
378. **Newberry R. and Hall J.** (1990). Use of pen space by broiler-chickens-Effects of age and pen size. *Applied Animal Behaviour Science*. **25**: 125-136.
379. **Newcombe M. and Summers L.** (1984). Effect of increasing cellulose in diets fed as crumbles or mash on the food intake and weight gains of broiler and leghorn chicks. *British Poultry Science*. **26**: 35-42.
380. **Nicol C. and Scott G.** (1990). Pre-slaughter handling and transport of broiler chickens. *Applied Animal Behaviour Science*. **28**: 57-73.
381. **Niewold T.** (2007). The nonantibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth promoters, the real mode of action? A hypothesis. *Poultry Science* **86**: 605-609.
382. **Nir I., Hillel R., Ptichi L. and Shefet G.** (1995). Effect of particle size on performance. 3. Grinding pelleting interactions. *Poultry Science*. **74**: 771-783.
383. **Norton R., Hopkins B., Skeeles J., Beasley J. and Kreeger J.** (1992). High mortality of domestic turkeys associated with *Ascaridia dissimilis*. *Avian Diseases*. **36**: 469-473.
384. **Norusis M.** (1999). *SPSS 9.0: Guide to Data Analysis*. Prentice Hall, New Jersey.
385. **Novoa-Garrido M., Larsen S. and Kaldhusdal M.** (2006). Association between gizzard lesions and increased caecal *Clostridium perfringens* counts in broiler chickens. *Avian Pathology*. **35**: 367-372.
386. **Nurmi E. and Rantala M.** (1973). New aspects of Salmonella infection in broiler production. *Nature*. **241**: 210-211.
387. **O'Toole D., Mills K., Ellis R., Farr R. and Davis M.** (1993). Clostridial enteritis in red Lories (*Eos bounea*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. **5**: 111-113.
388. **Ojano-Dirain C. and Waldroup P.** (2002). Protein and amino acid needs of broilers in warm weather: A Review. *International Journal of Poultry Science*. **1**: 40-46.
389. **Olkowski A., Wojnarowicz C., Chirino-Trejo M. and Drew M.** (2006). Responses of broiler chickens orally challenged with *Clostridium perfringens* isolated from field cases of necrotic enteritis. *Research in Veterinary Science*. **81**: 99-108.
390. **Olkowski A., Wojnarowicz C., Chirino-Trejo M., Laarveld B. and Sawicki G.** (2008). Sub-clinical necrotic enteritis in broiler chickens: novel etiological consideration based on ultra-structural and molecular changes in the intestinal tissue. *Research in Veterinary Science*. **85**: 543-553.
391. **Onderka D., Langevin C. and Hanson J.** (1990). Fibrosing cholehepatitis in broiler chickens induced by bile duct ligations or inoculation of *Clostridium perfringens*. *Canadian Journal of Veterinary Research*. **54**: 285-290.
392. **Ono M., Okuda Y., Yazawa S., Shibata I., Tanimura N., Kimura K., Haritani M., Mase M. and Sato S.** (2001). Epizootic outbreaks of gizzard erosion associated with adenovirus infection in chickens. *Avian Diseases*. **45**: 268-275.
393. **Osterblad M., Jarvinen H., Lonnqvist K., Huikko S., Laippala P., Viljanto J., Arvilommi H. and Huovinen P.** (2003). Evaluation of a new cellulose sponge-tipped swab for microbiological sampling: a laboratory and clinical investigation. *Journal of clinical microbiology*. **41**: 1894-1900.

394. **Oyawoye E. and Krueger W.** (1990). Potential of chemical regulation of food intake and body weight of broiler breeder chicks. *British Poultry Science*. **31**: 735-742.
395. **Page S.** (2006). Current use of antimicrobial growth promoters in food animals: The benefits. Barug D., De Jong J., Kies A. K. and Versteegen M. (Eds). *Antimicrobial Growth Promoters: Where do we go from here?* 19-51 p., Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.
396. **Parish W.** (1961). Necrotic enteritis in the fowl (*Gallus gallus domesticus*). I. Histopathology of the disease and isolation of a strain of *Clostridium welchii*. *Comparative Pathology*. **71**: 377-393.
397. **Park S., Kim W., Birkhold S., Kubena L., Nisbet D. and Ricke S.** (2004). Induced moulting issues and alternative dietary strategies for the egg industry in the United States. *World's Poultry Science Journal*. **60**: 196-209.
398. **Patterson L., Johnson L. and Edgar S.** (1961). The comparative resistance of several inbred lines of S.C. White Leghorns to certain infectious diseases. *Poultry Science*. **40**: 1442.
399. **Pattison M.** (2002). Some clinical and pathological features of enteritis in broilers-observations on treatment in the UK. *Proceedings of the Poultry Enteritis Conference*. 1-10 p., Elanco Animal Health. Cambridge, England.
400. **Pedersen K., Bjerrum L., Heuer O., Wong D. and Nauerby B.** (2008). Reproducible infection model for *Clostridium perfringens* in broiler chickens. *Avian diseases*. **52**: 34-39.
401. **Pesti G. and Howarth B.** (1983). Effects of population density on the growth, organ weights, and plasma corticosterone of young broiler chicks. *Poultry Science*. **62**: 1080-1083.
402. **Petersen C.** (1997). Practical application of whole grain feeding. *Proceedings of the 11<sup>th</sup> European Symposium on Poultry Nutrition*. 6-15 p., Faaborg, Denmark.
403. **Petersen S., Wiseman J. and Bedford M.** (1999). Effects of age and diet on the viscosity of intestinal contents in broiler chicks. *British Poultry Science*. **40**: 364-370.
404. **Petit L., Gibert M. and Popoff M.** (1999). *Clostridium perfringens*: Toxinotype and genotype. *Trends in Microbiology*. **7**: 104-110.
405. **Pettit-Riley R. and Estevez I.** (2001). Effects of density on perching behaviour of broiler chickens. *Applied. Animal Behaviour Science*. **71**: 127-140.
406. **Phillips I., Casewell M., Cox T., De Groot B., Friis C., Jones R., Nightingale C., Preston R. and Waddell J.** (2004). Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **53**: 28-52.
407. **Piel C., Montagne L., Sève B. and Lallès J.** (2005). Increasing digesta viscosity using carboxymethyl cellulose in weaned piglets stimulates ileal goblet cell numbers and maturation. *Journal of Nutrition*. **135**: 86-91.
408. **Pinchasov Y. and Elmaliah S.** (1994). Broiler chick responses to anorectic agents: 1. Dietary acetic and propionic acids and the digestive system. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. **48**: 371-376.
409. **Pinchasov Y. and Jensen L.** (1989). Comparison of physical and chemical means of feed restriction in broiler chicks. *Poultry Science*. **68**: 61-69.
410. **Plavnik I. and Hurwitz S.** (1991). Response of broiler chickens and turkey poults to food restriction of varied severity during early life. *British Poultry Science*. **32**: 343-352.
411. **Porter R.** (1998). Bacterial enterides of poultry. *Poultry Science*. **77**: 1159-1165.

412. **Prescott J.** (1979). The prevention of experimentally induced necrotic enteritis in chickens by avoparcin. *Avian Diseases*. **23**: 1072-1074.
413. **Proudfoot F., Hulan H. and Ramey D.** (1979). Effect of 4 stocking densities on broiler carcass grade, the incidence of breast blisters, and other performance traits. *Poultry Science*. **58**: 791-793.
414. **Puron D., Santamaria R., Segura J. and Alamilla J.** (1995). Broiler performance at different stocking densities. *Journal of Applied Poultry Research*. **4**: 55-60.
415. **Pusztai A. and Bardocz S.** (1996). Biological effects of plant lectins on the gastrointestinal tract: Metabolic consequences and applications. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*. **8**: 149-165.
416. **Quinn P., Carter M., Markey B. and Carter G.** (1994). *Clinical Veterinary Microbiology*. Wolfe Publishing. London, UK.
417. **Randall C., Kirkpatrick K. and Pearson D.** (1986). Liver abnormality in broilers. *Veterinary Record*. **119**: 576.
418. **Reece F., Lott B. and Deaton J.** (1985). The effects of feed form, grinding method, energy level, and gender on broiler performance in a moderate (21°C) environment. *Poultry Science*. **64**: 1834-1839.
419. **Regnier J. and Kelley K.** (1981). Heat- and cold-stress suppresses in vivo and in vitro cellular immune responses of chickens. *American Journal of Veterinary Research*. **42**: 294-299.
420. **Regnier J., Kelley K. and Gaskins C.** (1980). Acute thermal stressors and synthesis of antibodies in chickens. *Poultry Science*. **59**: 985-990.
421. **Rehman H., Wilfried V., Wageha A. and Jürgen Z.** (2007). Indigenous bacteria and bacterial metabolic products in the gastrointestinal tract of broiler chickens. *Archives of Animal Nutrition*. **61**: 319-335.
422. **Reid C. and Hillman K.** (1999). The effects of retrogradation and amylose/amylopectin ratio of starches on carbohydrate fermentation and microbial populations in the porcine colon. *Animal Science*. **68**: 503-510.
423. **Reid W. and Pitois M.** (1965). The influence of coccidiosis on feed and water intake of chickens. *Avian Diseases*. **9**: 343-348.
424. **Rice J. and Botsford H.** (1925). *Practical Poultry Management*. 3<sup>rd</sup> Edition. John Wiley and Sons, Inc., New York, USA.
425. **Richards J., Gong J. and De Lange C.** (2005). The gastrointestinal microbiota and its role in monogastric nutrition and health with an emphasis on pigs: Current understanding, possible modulations, and new technologies for ecological studies. *Canadian Journal of Animal Science*. **85**: 421-435.
426. **Riddell C. and Kong X.** (1992). The influence of diet on necrotic enteritis in broiler chickens. *Avian Diseases*. **36**: 499-503.
427. **Roberfroid M.** (2005). Introducing inulin-type fructans. *British Journal of Nutrition*. **93**: S13-S25.
428. **Rood J. and Cole S.** (1991). Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. *Microbiological Reviews*. **55**: 621-648.
429. **Rose M.** (1973). Immunity. Hammond D. and Long P. (Eds.). *The Coccidia: Eimeria, Isospora, Toxoplasma, and Related Genera*. 295-341 p., University Park Press. Baltimore, USA.
430. **Ross Technology 98/36.** (1999). Necrotic enteritis and associated conditions in broiler chickens. 1-6 p.
431. **Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals.** (2002). Welfare standards for chickens. *Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals*. West Sussex, UK.

432. **Ruben J.** (1996). Evolution of endothermy in mammals, birds and their ancestors. Johnston I. and Bennett A. (Eds). *Animals and Temperature: Phenotypic and Evolutionary Adaptation*. 347-376 p., Cambridge University Press. Cambridge, UK.
433. **Ruff M.** (1978). Malabsorption from the intestine of birds with coccidiosis. Long P., Boorman K. and Freeman B. (Eds). *Avian Coccidiosis*. 281-295 p., British Poultry Science. Edinburgh, UK.
434. **Ruff M., Johnson J., Dykstra D. and Reid W.** (1974). Effects of *Eimeria acervulina* on intestinal pH in conventional and gnotobiotic chickens. *Avian Diseases*. **18**: 96-104.
435. **Ryley J.** (1980). Drug resistance in coccidia. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*. **24**: 99-120.
436. **Sakurai J., Nagahama M. and Ochi S.** (1997). Major toxins of *Clostridium perfringens*. *Toxin Reviews*. **16**: 195-214.
437. **Sanotra G., Lawson L. and Vestergaard K.** (2001α). Influence of stocking density on tonic immobility, lameness, and tibial dyschondroplasia in broilers. *Journal of Applied Animal Welfare Science* **4**: 71-87.
438. **Sanotra G., Lund J. and Vestergaard K.** (2002). Influence of light-dark schedules and stocking density on behaviour, risk of leg problems and occurrence of chronic fear in broilers. *British Poultry Science*. **43**: 344-354.
439. **Sanotra G., Lund J., Ersboll A., Petersen J. and Vestergaard K.** (2001β). Monitoring leg problems in broilers: A survey of commercial broiler production in Denmark. *World's Poultry Science Journal*. **57**: 55-69.
440. **Santin E., Maiorka A., Polveiro W., Paulillo A., Laurentiz A., Borges S. and Fischer da Silva A.** (2003). Effect of environmental temperature on immune response of broilers. *Journal of Applied Poultry Research*. **12**: 247-250.
441. **Sasaki J., Goryo M. and Okada K.** (2000). Cholangiohepatitis in chickens induced by bile duct ligations and inoculation of *Clostridium perfringens*. *Avian Pathology*. **29**: 405-410.
442. **Sasaki J., Goryo M., Furukawa H., Okoshi N. and Okada K.** (1997). Pathology of cholangiohepatitis in broiler chickens, isolation and identification of *Clostridium perfringens* from affected livers, and experimental study in chicks inoculated with *C. perfringens*. *Journal of the Japanese Society on Poultry Diseases*. **33**: 79-85.
443. **Sasaki Y., Yamamoto K., Tamura Y. and Takahashi T.** (2001). Tetracycline resistance genes of *Clostridium perfringens*, *Clostridium septicum* and *Clostridium sordellii* isolated from cattle affected with malignant edema. *Veterinary Microbiology*. **83**: 61-69.
444. **Sato H., Yamakawa Y., Ito A. and Murata R.** (1977). Effect of protease on the production of *C. perfringens* alpha toxin. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*. **30**: 44-46.
445. **Sato T., Tezuka K., Shibuya H., Watanabe T., Kamata H. and Shirai W.** (2002). Cold-induced ascites in broiler chickens and its improvement by temperature controlled rearing. *Avian Diseases*. **46**: 989-996.
446. **Savory C.** (1974). Growth and behaviour of chickens fed on pellets or mash. *British Poultry Science*. **15**: 281-286.
447. **Scheideler S. and Baughman G.** (1993). Computerized early feed restriction programs for various strains of broilers. *Poultry Science*. **72**: 236-242.

448. **Schiemann D.** (1977). Laboratory confirmation of an outbreak of *Clostridium perfringens* food poisoning. *Health Laboratory Science*. **14**: 35-38.
449. **Schneider S., Le Gall P., Girard-Pipau F., Piche T., Pompei A., Nano J., Hébuterne X. and Rampal P.** (2000). Total artificial nutrition is associated with major changes in the fecal flora. *European Journal of Nutrition*. **39**: 248-255.
450. **Schnitzler B. and Shirley M.** (1999). Immunological aspects of infections with *Eimeria maxima*: a short review. *Avian Pathology*. **28**: 537-543.
451. **Schuring M. and van Gils B.** (2001). *Clostridium perfringens*: a nutritional challenge? *Feed Mix*. **9**: 26-28.
452. **Scott T. and Balnave D.** (1988). Influence of dietary energy, nutrient density and environmental-temperature on pullet performance in early lay. *British Poultry Science*. **29**: 155-165.
453. **Shanawany M.** (1988). Broiler performance under high stocking densities. *British Poultry Science*. **29**: 43-52.
454. **Shane S.** (2004). Update on the poultry disease situation in the USA. *Poultry International* **43**: 10-15.
455. **Shane S. and Van Der Sluis W.** (2002). Global diseases update 2002: more problems to be solved. *World Poultry*. **18**: 28-31.
456. **Shane S., Gyimah J., Harrington K. and Snider T. 3rd.** (1985). Etiology and pathogenesis of necrotic enteritis. *Veterinary Research Communication*. **9**: 269-287.
457. **Shane S., Koetting D. and Harrington K.** (1984). The occurrence of *Clostridium perfringens* in the intestine of chicks. *Avian Diseases*. **28**: 1120-1124.
458. **Shariatmadari F. and Torshizi R.** (2004). Feed restriction and compensatory growth in chicks: effects of breed, sex, initial body weight and level of feeding. *Spring Meeting of the WPSA UK Branch. British Poultry Science*. **45**: S52.
459. **Shimizu T., Ohtani K., Hirakawa H., Ohshima K., Yamashita A., Shiba T., Ogasawara N., Hattori M., Kuhara S. and Hayashi H.** (2002). Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **99**: 996-1001.
460. **Shinder D., Luger D., Rusal M., Rzepakovsky V., Bresler V. and Yahav S.** (2002). Early age cold conditioning in broiler chickens (*Gallus gallus domesticus*): thermotolerance and growth responses. *Journal of Thermal Biology*. **27**: 517-523.
461. **Shirley M.** (1988). Coccidiosis: interaction of immunity and disease with management and environment. *Proceedings of the 2<sup>nd</sup> Asian/Pacific Poultry Health Conference*. 107-126 p., Surfers' Paradise, Australia.
462. **Shirley M.** (1989). Development of a live attenuated vaccine against coccidiosis of poultry. *Parasitol. Immunology*. **11**: 117-124.
463. **Shirley M.** (1996). New methods for the identification of species and strains of *Eimeria*. McDougald L., Long P. and Joyner L. (Eds). *Research in avian coccidiosis*. 13-35p., Athens, Georgia, USA.
464. **Shirley M. and Bedrnik P.** (1997). Live attenuated vaccines against avian coccidiosis: success with precocious and egg-adapted lines of *Eimeria*. *Parasitology Today*. **13**: 481-484.
465. **Shirley M. and Long P.** (1990). Control of coccidiosis in chickens: immunization with live vaccines. Long L. (Ed.). *Coccidiosis of Man and Domestic Animals*. 321-341 p., CRC Press. Boca Raton, Florida, USA.
466. **Shirley M., Jeffers T. and Long P.** (1983). Studies to determine the taxonomic status of *Eimeria mitis*, Tyzzer 1929 and *E. mivati*, Edgar and Seibold 1964. *Parasitology*, **87**: 185-198.

467. **Shirley M., Smith A. and Blake D.** (2007). Challenges in the successful control of the avian coccidian. *Vaccine*. **25**: 5540-5547.
468. **Si W., Gong J., Han Y., Yu H., Brennan J., Zhou H. and Chen S.** (2007). Quantification of cell proliferation and alpha-toxin gene expression of *Clostridium perfringens* in the development of necrotic enteritis in broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*. **73**: 7110-7113.
469. **Siegel H.** (1960). Effects of population density on the pituitary adrenal cortical axis of cockerels. *Poultry Science*. **39**:500-510.
470. **Siegel H.** (1980). Physiological stress in birds. *Bio Science*. **301**:529-533.
471. **Silverstone T. and Kyriakides M.** (1982). Clinical pharmacology of appetite. Silverstone T. (Ed). *Drugs and appetite*. 93-123 p., Academic Press. New York and London, USA.
472. **Simon E.** (1989). Nervous control of cold defence in birds. Bech C. and Reinertsen R. (Eds). *Physiology of Cold Adaptation in Birds*. 1-15 p., Plenum, New York.
473. **Simon O., Vahjen W. and Taras D.** (2004). Interaction of nutrition with intestinal microbial communities. Tucker L. and Taylor-Pickard J. (Eds). *Interfacing immunity, gut health and performance*. 33-46 p., Nottingham University Press, Nottingham, United Kingdom.
474. **Smirnov A., Sklan D. and Uni Z.** (2004). Mucin dynamics in the chick small intestine are altered by starvation. *Journal of Nutrition*. **134**: 736-742.
475. **Smith H.** (1965). The development of the flora of the alimentary tract in young animals. *Journal of Pathology and Bacteriology*. **90**: 495-513.
476. **Songer J.** (1996). Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clinical Microbiology Reviews*. **9**: 216-34.
477. **Sørensen P., Su G. and Kestin S.** (2000). Effects of age and stocking density on leg weakness in broiler chickens. *Poultry Science*. **79**: 864-870.
478. **Starr M. and Reynolds D.** (1951). Streptomycin resistance of coliform bacteria from turkeys fed streptomycin. *Proceedings of the 51<sup>st</sup> General Meeting*. 15-34 p., Society of American Bacteriology. Chicago, USA.
479. **Stevens D. and Rood J.** (2000). Histotoxic clostridia. *Gram-positive pathogens*. 563-572 p., ASM Press, Washington, USA.
480. **Stokestad E. and Jukes T.** (1950). The multiple nature of the animal protein factor. *Journal of Biological Chemistry* **180**: 647-654.
481. **Stutz M. and Lawton G.** (1984). Effects of diet and antimicrobials on growth, feed efficiency, intestinal *Clostridium perfringens*, and ileal weight of broiler chicks. *Poultry Science*. **63**: 2036-2042.
482. **Stuve G., Hofshagen M. and Holt G.** (1992). Necrotizing lesions in the intestine, gizzard, and liver in captive capercaillies (*Tetrao-urogallus*) associated with *Clostridium perfringens*. *Journal of wildlife diseases* **28**: 598-602.
483. **Suzuki K., Harasawa Y., Yoshitake Y. and Mitsuoka T.** (1983). Effects of crowding and heat stress on intestinal flora, body weight gain, and feed efficiency of growing rats and chicks. *Japanese Journal of Veterinary Science*. **45**: 331-338.
484. **Svensson E., Raberg L., Koch C. and Hasselquist D.** (1998). Energetic stress, immunosuppression and the costs of an antibody response. *Functional Ecology*. **12**: 912-919.

485. **Svihus B., Juvik E., Hetland H. and Krogdahl A.** (2004). Causes for improvement in nutritive value of broiler chicken diets with whole wheat instead of ground wheat. *British Poultry Science*. **45**: 55-60.
486. **Svihus B., Uhlen A. and Harstad O.** (2005). Effect of starch granule structure, associated components and processing on nutritive value of cereal starch: A review. *Animal Feed Science and Technology*. **122**: 303-320.
487. **Tablante N., Estevez I. and Russek-Cohen E.** (2003). Effect of perches and stocking density on tibial dyschondroplasia and bone mineralization as measured by bone ash in broiler chickens. *Journal of Applied Poultry Research*. **12**: 53-59.
488. **Tankson J., Vizzier-Thaxton Y., Thaxton J., May J. and Cameron J.** (2001). Stress and nutritional quality of broilers. *Poultry Science*. **80**: 1384-1389.
489. **Teeter R.** (1994). Optimizing production of heat stressed broilers. *Poultry Digest*. **May**: 10-16.
490. **Tester R. and Karkalas J.** (2004). Starch structure and digestibility. Enzyme substrate relationship. *World's Poultry Science Journal*. **60**: 186-195.
491. **Thaxton J., Dozier W., Branton S., Morgan G., Miles D., Roush W., Lott B. and Vizzier-Thaxton Y.** (2006). Stocking density and physiological adaptive responses of broilers. *Poultry Science*. **85**: 819-824.
492. **Thaxton J., Sadler C. and Glick B.** (1968). Immune response of chickens following heat exposure or injections with ACTH. *Poultry Science*. **47**: 264-266.
493. **Thaxton P. and Siegel H.** (1970). Immunodepression in young chickens by high environmental temperature. *Poultry Science*. **49**: 202-205.
494. **Thomke S. and Elwinger K.** (1998). Growth promotants in feeding pigs and poultry. I. Growth and feed efficiency responses to antibiotic growth promotants (Reprinted from the Journal of the Royal Swedish Academy of Agriculture and Forestry, 136: 9-21, 1997). *Annales de zootechnie*. **47**: 85-97.
495. **Thompson K. and Applegate T.** (2006). Feed withdrawal alters small-intestinal morphology and mucus of broilers. *Poultry Science*. **85**: 1535-1540.
496. **Thompson K., Burkholder K., Patterson J. and Applegate T.** (2008). Microbial ecology shifts in the ileum of broilers during feed withdrawal and dietary manipulations. *Poultry Science*. **87**: 1624-1632.
497. **Timbermont L., Lanckriet A., Gholamiandehkordi A., Pasmans F., Martel A., Haesebrouck F., Ducatelle R. and Van Immerseel F.** (2008). Origin of *Clostridium perfringens* isolates determines the ability to induce necrotic enteritis in broilers. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. In press.
498. **Tisljar M., Grabarevic Z., Artukovic B., Šimec Z., Dzaja P., Vranesic D., Bauer A., Tudja M., Herak-Perkovic V., Juntos P. and Pogacnik M.** (2002). Gizzerosine-induced histopathological lesions in broiler chicks. *British Poultry Science*. **43**: 28-35.
499. **Titball R., Naylor C. and Basak A.** (1999). The *Clostridium perfringens*  $\alpha$  toxin. *Anaerobe*. **5**: 51-64.
500. **Tomhave A. and Seeger K.** (1945). Floor space requirements of broilers. *Delaware Agric. Exp. Sta. Bull.* 255.
501. **Tottori J., Yamaguchi R., Murakawa Y., Sato M., Uchida K. and Tateyama S.** (1997). The use of feed restriction for mortality control of chickens in broilers farms. *Avian Diseases* **42**: 433-437.
502. **Truscott R. and Al-Sheikhly F.** (1977). Reproduction and treatment of necrotic enteritis in broilers. *American Journal of Veterinary Research*. **38**: 857-861.



503. **Tsutsui K., Minami J., Matsushita O., Katayama S., Taniguchi Y., Nakamura S., Nishioka M. and Okabe A.** (1995). Phylogenetic analysis of phospholipase C genes from *Clostridium perfringens* types A to E and *Clostridium novyi*. *Journal of Bacteriology*. **177**: 7164-7170.
504. **Urdaneta Rincon M.** (2000). Mild feed restriction and compensatory growth in the broiler chicken. *PhD thesis*, Faculty of Graduate Studies, University of Guelph, Canada.
505. **Uribe A., Alam M., Midtvedt T., Smedfors B. and Theodorsson E.** (1997). Endogenous prostaglandins and microflora modulate DNA synthesis and neuroendocrine peptides in the rat gastrointestinal tract. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. **32**: 691-699.
506. **USDA.** (2000). NAHMS Layers. Pages 17-18 in Part II: *Reference of 1999 Table egg layer management in the U.S.* USDA, Washington, USA.
507. **Vahjen W., Glaeser K., Schaefer K. and Simon O.** (1998). Influence of xylanase-supplemented feed on the development of selected bacterial groups in the intestinal tract of broiler chicks. *Journal of Agricultural Science*. **130**: 489-500.
508. **Van der Sluis W.** (2000). Clostridial enteritis is an often underestimated problem. *World Poultry*. **16**: 42-43.
509. **Van Horne P. and Achterbosch T.** (2008). Animal welfare in poultry production systems: impact of EU standards on world trade. *World's Poultry Science Journal*. **64**: 40-52.
510. **Van Loon D., Hangalapura B., de Vries Reilingh G., Nieuwland M., Kemp B. and Parmentier H.** (2004). Effect of three different housing systems on immune responses and body weight of chicken lines divergently selected for antibody responses to sheep red blood cells. *Livestock Production Science*. **85**: 139-150.
511. **Varga J., Nguyen V., O'Brien D., Rodgers K., Walker R. and Melville S.** (2006). Type IV pili-dependent gliding motility in the Gram-positive pathogen *Clostridium perfringens* and other Clostridia. *Molecular Microbiology*. **62**: 680-694.
512. **Vermeulen A., Schaap D. and Schetters T.** (2001). Control of coccidiosis in chickens by vaccination. *Veterinary Parasitology*. **100**: 13-20.
513. **Veterinary Medicines Directorate.** (2000). Sales of antimicrobial products used as veterinary medicines or growth promoters in the UK from 1993–1998. London, U.K. April 2000.
514. **Veterinary Medicines Directorate.** (2002). Sales of antimicrobial products authorised for use as veterinary medicines, antiprotozoals, antifungals, growth promoters and coccidiostats in the UK in 2002. London, U.K. June 2002.
515. **Viera S.** (2003). Nutritional implications of mould development in feedstuffs and alternatives to reduce the mycotoxin problem in poultry feeds. *World's Poultry Science Journal*. **59**: 111-122.
516. **Vissiennon T., Kroger H., Kohler T. and Kliche R.** (2000). Effect of avilamycin, tylosin and ionophore anticoccidials on *Clostridium perfringens* enterotoxaemia in chickens. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* **113**: 9-13.
517. **Vissiennon T., Menger S. and Langhof I.** (1996). Hepatic and renal ultrastructural lesions in experimental *Clostridium perfringens* type A enterotoxaemia in chickens. *Avian diseases*. **40**: 720-724.

518. **Vo K., Boone M. and Johnston W.** (1978). Effect of three lifetime ambient temperatures on growth, feed and water consumption and various blood components in male and female Leghorn chickens. *Poultry Science*. **57**: 798-803.
519. **Wabeck C.** (1972). Feed and water withdrawal time relationship to processing yield and potential fecal contamination of broilers. *Poultry Science*. **51**: 1119-1121.
520. **Wages D.** (2003). Ulcerative Enteritis. Saif Y., Barnes H., Glisson J., Fadly A., McDougald L. and Swayne D. (Eds). *Diseases of Poultry* 11<sup>th</sup> Edition. 776-780 p., Iowa State Press. Blackwell Publishing Company.
521. **Wages D. and Opengart K.** (2003). Necrotic enteritis. Saif Y., Barnes H., Glisson J., Fadly A., McDougald L. and Swayne D. (Eds). *Diseases of Poultry* 11<sup>th</sup> Edition. 781-785 p., Iowa State Press. Blackwell Publishing Company. Iowa, USA.
522. **Waldenstedt L., Elwinger K., Lunden A., Thebo P., Bedford M.R. and Ugglā A.** (2000). Intestinal digesta viscosity decreases during coccidial infection in broilers. *British Poultry Science*. **41**: 459-464.
523. **Waldenstedt L., Lunden A., Elwinger K., Thebo P. and Ugglā A.** (1999). Comparison between a live, attenuated anticoccidial vaccine and an anticoccidial ionophore, on performance of broilers raised with or without a growth promoter, in an initially *Eimeria*-free environment. *Acta Veterinaria Scandinavica*. **40**: 11-21.
524. **Wallach M.** (2002). The development of CoxAbic® a novel vaccine against coccidiosis. *World Poultry*. **18**: 2-4.
525. **Wallach M., Ashash U., Michael A. and Smith N.** (2008). Field application of a subunit vaccine against an enteric protozoan disease. *PLoS ONE*. **3**: e3948.
526. **Wang G., Ekstrand C. and Svedberg J.** (1998). Wet litter and perches as risk factors for the development of foot pad dermatitis in floor-housed hens. *British Poultry Science*. **39**: 191-197.
527. **Watkins K., Shryock T., Dearth R. and Saif Y.** (1997). *In vitro* antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* from commercial turkey and broiler chicken origin. *Veterinary Microbiology*. **54**: 195-200.
528. **Waxler S.** (1941). Immunization against caecal coccidiosis in chickens by the use of X-ray attenuated oocysts. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. **99**: 481-485.
529. **Weaver W. and Meijerhof R.** (1991). The effect of different levels of relative-humidity and air movement on litter conditions, ammonia levels, growth, and carcass quality for broiler chickens. *Poultry Science*. **70**: 746-755.
530. **Webster A.** (2003). Physiology and behavior of the hen during induced molt. *Poultry Science*. **82**: 992-1002.
531. **Weurding R., Veldman A., Veen A., Van Der Aar P. and Verstegen M.** (2001). Starch digestion rate in the small intestine of chickens differs among feedstuffs. *Journal of Nutrition*. **131**: 2329-2335.
532. **Whitehead C., Bollengier-Lee S., Mitchell M. And Williams P.** (1998). Vitamin E can alleviate the depressed egg production of heat-stressed laying hens. *Spring Meeting of the UK Branch of the World's-Poultry-Science-Association*. March, Scarborough England. *British Poultry Science*. **39**: S44-S46.
533. **Wideman R. and French H.** (1999). Broiler breeder survivors of chronic unilateral artery occlusion produce progeny resistant to pulmonary hypertension syndrome (ascites) induced by cold temperatures. *Poultry Science*. **78**: 404-411.

534. **Wierup M.** (2001). The Swedish experience of the 1986 year ban of antimicrobial growth promotors, with special reference to animal health, disease prevention, productivity and usage of antimicrobials. *Microbial Drug Resistance Mechanisms, Epidemiology and Disease*. **7**: 183-190.
535. **Wilkie D., Van Kessel A., White L., Laarveld B. and Drew M.** (2005). Dietary amino acids affect intestinal *Clostridium perfringens* populations in broiler chickens. *Canadian Journal of Animal Science*. **85**: 185-193.
536. **Williams B., Verstegen M. and Tamminga S.** (2001). Fermentation in the large intestine of single-stomached animals and its relationship to animal health. *Nutrition Research Reviews*. **14**: 207-227.
537. **Williams R.** (1992). Differences between the anticoccidial potencies of monensin in maize-based or wheat-based chicken diets. *Veterinary Research Communication*. **16**: 147-152.
538. **Williams R.** (1994). Safety of the attenuated anticoccidial vaccine 'paracox' in broiler chickens isolated from extraneous coccidial infection. *Veterinary Research Communication*. **18**: 189-198.
539. **Williams R.** (1997). Laboratory tests of phenolic disinfectants against the chicken coccidium *Eimeria tenella*. *Veterinary Record*. **141**: 447-448.
540. **Williams R.** (1998). Epidemiological aspects of the use of live anticoccidial vaccines for chickens. *International Journal for Parasitology*. **28**: 1089-1098.
541. **Williams R.** (1999 $\alpha$ ). A compartmentalized model for the estimation of the cost of coccidiosis to the world's chicken production industry. *International Journal for Parasitology*. **29**: 1209-1229.
542. **Williams R.** (1999 $\beta$ ). Anticoccidial vaccines: the story so far. *World Poultry, Special Supplement Coccidiosis*. **3**: 23-25.
543. **Williams R.** (2002). Anticoccidial vaccines for broiler chickens: pathways to success. *Avian Pathology*. **31**: 317-353.
544. **Williams R.** (2005). Intercurrent coccidiosis and necrotic enteritis of chickens: Rational, integrated disease management by maintenance of gut integrity. *Avian Pathology*. **34**: 159-180.
545. **Williams R. and Andrews S.** (2001). The origins and biological significance of the coccidial lesions that occur in chickens vaccinated with a live attenuated anticoccidial vaccine. *Avian Pathology*. **30**: 215-220.
546. **Williams R., Carlyle W., Bond D. and Brown I.** (1999). The efficacy and economic benefits of paracox, a live attenuated anticoccidial vaccine, in commercial trials with standard broiler chickens in the United Kingdom. *International Journal for Parasitology*. **29**: 341-355.
547. **Williams R., Marshall R., La Ragione R. and Catchpole J.** (2003). A new method for the experimental production of necrotic enteritis and its use for studies on the relationships between necrotic enteritis, coccidiosis and anticoccidial vaccination of chickens. *Parasitology Research*. **90**: 19-26.
548. **Williamson E. and Titball R.** (1993). A genetically engineered vaccine against the alpha-toxin of *Clostridium perfringens* protects mice against experimental gas gangrene. *Vaccine*. **11**: 1253-1258.
549. **Wilson J., Tice G., Brash M. and Hilaire S.** (2005). Manifestations of *Clostridium perfringens* and related bacterial enteritides in broiler chickens. *World's Poultry Science Journal*. **61**: 435-449.
550. **Wise M. and Siragusa G.** (2005). Quantitative detection of *Clostridium perfringens* in the broiler fowl gastrointestinal tract by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*. **71**: 3911-3916.
551. **Wobeser G. and Rainnie D.** (1987). Epizootic necrotic enteritis in wild geese. *Journal of wildlife diseases* **23**: 376-385.

552. **Wolfenson D., Berman A., Frei Y. and Snapir N.** (1978). Measurement of blood flow distribution by radioactive microspheres in the laying hens (*Gallus gallus domesticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. **61A**: 549-554.
553. **World Health Organization.** (2003). Impacts of antimicrobial growth promoter termination in Denmark. Pages 1-57 p. *Document WHO/CDS/CPE/ZFK/2003.1*. WHO, Foulum, Denmark.
554. **World Health Organization.** (2004). Proceedings of the Joint FAO/OIE/WHO expert workshop on non-human antimicrobial usage and antimicrobial resistance: Scientific assessment. 1-71 p. *Document WHO/CDS/DIP/ZFK/04.20*. Geneva, Switzerland.
555. **Yahav S.** (2000). Domestic fowl-Strategies to confront environmental conditions. *Avian and Poultry Biology Reviews*. **11**: 81-95.
556. **Yahav S. and Hurwitz S.** (1996). Induction of thermotolerance in male broiler chickens by temperature conditioning at an early age. *Poultry Science*. **75**: 402-406.
557. **Yahav S. and Plavnik I.** (1999). Effect of early-age thermal conditioning and food restriction of performance and thermotolerance of male broiler chickens. *British Poultry Science*. **40**: 120-126.
558. **Yalcin S., Özkan S., Turkmüt L. and Siegel P.** (2001). Responses to heat stress in commercial and local broiler stocks.1. Performance traits. *British Poultry Science*. **42**: 149-152.
559. **Yalcin S., Settari P., Özkan S. and Cahaner A.** (1997). Comparative evaluation of 3 commercial broiler stocks in hot vs temperate climates. *Poultry Science*. **78**: 1347-1352.
560. **Young R. and Craig A.** (2001). The use and misuse of antibiotics in UK agriculture - part 3. Residues of dangerous drugs in intensively produced chicken meat and eggs. Bristol, UK: The Soil Association.
561. **Yu M., Robinson F. and Roblee A.** (1992). Effect of feed allowance during rearing and breeding on female broiler breeders. 2. Ovarian morphology and production. *Poultry Science*. **71**: 1750-1761.
562. **Yu M., Robinson F., Clandinin M. and Bodnar L.** (1990). Growth and body composition of broiler chickens in response to different regimens of feed restriction. *Poultry Science*. **69**: 2074-2081.
563. **Yun C., Lillehoj H. and Lillehoj E.** (2000). Intestinal immune responses to coccidiosis. *Developmental and Comparative Immunology*. **24**: 303-324.
564. **Zar J.** (1999). *Biostatistical Analysis*. 4<sup>th</sup> Edition. Prentice Hall, New Jersey.
565. **Zhan X., Wang M., Ren H., Zhao R., Li J. and Tan Z.** (2007). Effect of early feed restriction on metabolic programming and compensatory growth in broiler chickens. *Poultry Science*. **86**: 654-60.
566. **Zhong C., Nakaue H., Hu C. and Mirosh L.** (1995). Effect of full feed and early feed restriction on broiler performance, abdominal fat level, cellularity, and fat metabolism in broiler chickens. *Poultry Science*. **74**: 1636-1643.
567. **Zhu X., Zhong T., Pandya Y. and Joerger R.** (2002). 16S rRNA-based analysis of microbiota from the caecum of broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**: 124-137.
568. **Zolman J.** (1993). *Biostatistics. Experimental Design and Statistical Inference*, Oxford University Press, Inc., New York.
569. **Zubair A. and Leeson S.** (1994). Effect of early feed restriction and realimentation on heat production and changes in sizes of digestive organs of male broilers. *Poultry Science*. **73**: 529-538.
570. **Zubair A. and Leeson S.** (1996). Compensatory growth in the broiler chicken: a review. *World's Poultry Science Journal*. **52**: 189-201.

571. **Zulkifli I., Dunnington E., Gross W., Larsen A., Martin A. and Siegel P.** (1993). Responses of dwarf and normal chickens to feed restriction, *Eimeria tenella* infection, and sheep red blood cell antigen. *Poultry Science*. **72**: 1630-1640.
572. **Zulkifli I., Norma M., Israf D. and Omar A.** (2000). The effect of early age feed restriction on subsequent response to high environmental temperatures in female broiler chickens. *Poultry Science*. **79**: 1401-1407.
573. **Zulkifli I., Siegel H., Mashaly M., Dunnington E. and Siegel P.** (1995). Inhibition of adrenal steroidogenesis, neonatal feed restriction, and pituitary-adrenal axis response to subsequent fasting in chickens. *General and Comparative Endocrinology*. **97**: 49-56.

### **Ελληνόγλωσση.**

1. **Αρτοποιός Ε.** (1992). Παρασιτικά νοσήματα των πτηνών. *Παθολογία των Πτηνών*. Σελ. 691-770, Υπηρεσία Δημοσιευμάτων ΑΠΘ, Θεσσαλονίκη.
2. **Γεωργοπούλου Ι.** (2009). *Παθολογία Πτηνών*. Τμήμα Εκδόσεων ΑΠΘ, Θεσσαλονίκη.
3. **Γιαννακόπουλος Α. και Τσερβένη-Γούση Α.** (2001). *Ορνιθοτροφία*. Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη.
4. **Μάγρας Ι.** (2004). Πεπτικό σύστημα. *Λειτουργική Ανατομική των Κατοικίδιων Πτηνών*. Σελ. 74-85. Εκδοτικός Οίκος Αδελφών Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη.
5. **Μπάτζιος Χρ.** (1999). Στατιστική, Τεύχος Α': *Εφαρμοσμένη Στατιστική στην Κτηνιατρική Εκπαίδευση*. Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη.
6. **Ράλλης Τ.** (2006). Συμπτωματική αντιμετώπιση περιστατικών με οξεία διάρροια. *Γαστρεντερολογία του σκύλου και της γάτας*. Δεύτερη έκδοση. Σελ. 161-164. University Studio Press, Θεσσαλονίκη.
7. **Χαραλαμπίδης Σ., Θεωδορίδης Ι., Φρύδας Σ., Παπαζαχαριάδου Μ. και Παπαδόπουλος Η.** (2006). *Παρασιτικά Νοσήματα των Κατοικίδιων Ζώων*. Τμήμα Εκδόσεων ΑΠΘ, Θεσσαλονίκη.