

**A REVIEW OF ABOMASAL DISPLACEMENT - CLINICAL AND  
LABORATORY EXPERIENCES AT THE CLINIC FOR RUMINANTS IN  
LJUBLJANA**

T. ZADNIK, M. MESARIČ, P. REICHEL

Key words: veterinary medicine; abomasum; displacement; clinical examination; blood analysis; omentopexy; cattle

During the period 1991 - 2001, 161 cases of abomasum displacement were treated. Clinical and laboratory examinations, and later surgical intervention, revealed that 100 (62.1 %) cases were left-side displacements of the abomasum (LDA), 16 (9.9 %) were right-side displacements (RDA), 25 (15.5 %) cases involved torsion of the abomasum (AV) and 20 (12.4 %) were anterior displacements of the abomasum (ADA). In ADA the typical characteristics of the disease signs remain mild, unclear and variable, until the diagnosis is established. Over a half of the 20 affected cows (63.16 %) were between 7.5 to 9.0 months pregnant. Specific, high-pitched, tinkling sounds were detected in the left caudoventral, and right lateral, abdominal regions, just behind the limits of percussible lung area. There was no specific tympanitic resonance (ping effect) established with the percussion and simultaneous auscultation of the left abdomen, which included the left and right paralumbar fossa and an area extending from the midpoint of the 9th and 13th ribs. Rumination did not cease. Clinical signs were manifested by periparturient stubborn indigestion, loss of weight, relative absence of faeces and suboptimal milk production. Among laboratory findings ketonemia, mild haemoconcentration, slight hypochloreaemia, hypokalaemia and hypocalcaemia were present. At the Clinic for Ruminants in Ljubljana, the surgical correction of all types of abomasal displacements is now commonly practised. On the basis of our experiences we have developed a method of omentopexy which is called the "Ljubljana method".

---

Delo je prispelo: 16. julija 2001.

Naslov avtorjev: doc. dr. Tomaž Zadnik, dr. vet. med., e-pošta: zadnikto@mail.vf.uni-lj.si, mag. Matjaž Mesarič, dr. vet. med., e-pošta: mesarima@mail.vf.uni-lj.si, Klinika za prežvekovalce, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Cesta v Mestni log 47, 1000 Ljubljana; doc. dr. Peter Reichel, dr. vet. med., e-pošta: reichel@uvm.sk, Department of Internal Diseases Ruminants and Pigs, University of Veterinary Medicine, Komenskeho, Košice, Slovaška.

Citirati: Zadnik T, Mesarič M, Reichel P. A review of abomasal displacement - clinical and laboratory experiences at the Clinic for Ruminants in Ljubljana. Slov Vet Res 2001; 38 (3): 193-208.

## **PREGLED DISLOKACIJ SIRIŠČNIKA - KLINIČNE IN LABORATORIJSKE IZKUŠNJE NA KLINIKI ZA PREŽVEKOVALCE V LJUBLJANI**

Ključne besede: veterinarska medicina; siriščnik; dislokacija; klinična preiskava; analiza krvi; omentopeksija; govedo

Od leta 1991 do 2001 smo obdelali 161 krav z dislokacijo siriščnika. S klinično preiskavo krav, laboratorijsko analizo krvi ter kirurško intervencijo smo ugotovili 100 (62,1 %) levih (LDA), 16 (9,9 %) desnih (RDA) in 20 (12,4 %) sprednjih (ADA) dislokacij siriščnika ter 25 (15,5 %) zasukov (TA). ADA ima tipičen potek, bolezenska znamenja so klinično nejasna, srednje težka in spreminjajoča se. Od 20 krav z ADA je bilo več kot pol (63,16 %) brejih od 7,5 do 9,0 mesecev. Pri kravah z ADA smo z avskultacijo na levi in desni strani trebuha v kavdoventralnem predelu, neposredno za pljučno mejo, ugotovili specifičen visok kovinski cingljajoči zvok. S simultanim pretrkavanjem in oslušovanjem trebuha v področju leve in desne lakotnice ter področja med 9. in 13. rebrom nismo ugotovili za dislokacijo siriščnika značilnega ping efekta. Klinična slika ADA se je izražala kot obporodna trdovratna prebavna motnja z izgubo telesne teže, količinsko majhnim izločanjem iztrebkov in neoptimalno proizvodnjo mleka. Laboratorijski izvidi krvi so pokazali, da so ketonemija srednje stopnje, hemokonzracija, blaga hipokalcemija, hipokloremija in hipokalemija najočitnejša bolezenska znamenja. Naše izkušnje so pokazale, da je kirurška intervencija za vse vrste dislokacije siriščnika najprimernejša. Ne glede na tip dislokacije priporočamo učvrstitev siriščnika z omentopeksijo po ljubljanski metodi.

### **Introduction**

The dairy cow has been selectively bred to produce considerably more milk than is required by any calf, and with good management, she will produce it for three-quarters of her life in the dairy herd. This requires a much greater intake of nutrients than the traditional high-fibre diet of cattle, particularly at the beginning of lactation, so nutritionists are constantly trying to devise means of increasing the cow's nutrient intake while maintaining stability in her metabolism (1, 2).

Too many dairy cows culled after only 1 to 4 lactations are chronically lame or skinny and appear to be "worn out" by sustained hard work. The main welfare and health problems encountered by dairy cows can be attributed to the systems of feeding, housing, milking and management that are unsuited to the genotype of the high yielding cow.

An increased incidence and epidemiological studies have shown that the diseases associated with "negative energy balance- hepatic lipidosis - hypocalcaemia" during the six critical weeks are: clinical and subclinical forms of milk fever (28, 29, 34), retained placentas (28), toxemia in recently calved cows - septic metritis (36), a 4 to 7 times greater risk of developing abomasal displacement (29, 31), impaired ruminal contractions (32), lethargy and inappetence in early lactation (29), a reduced uterine involution (28), a prolapsed uteri (33), reproductive disorders (29, 30) and mastitis

(67). The most important period in the milk production period is the transition between late pregnancy and early lactation. In this period an enormous metabolic challenge to the high-yielding dairy cow occurs. Proper management of the late pregnant dry cow period should be portrayed to dairy producers as an investment in the future. Not enough is presently understood about the effects of feed intake during the dry period on subsequent milk yields and the incidence of displacement of the abomasum, milk fever, fatty liver, and udder oedema. These relationships are still under investigation at the time of writing this article (1, 2, 39, 40, 46, 47, 48, 53, 64, 67).

#### *The definition and classification of abomasal displacement (AD)*

AD is the result of positional changes of abdominal viscera during late pregnancy, or of abomasal atony resulting from various factors (3). In this disease, the abomasum is displaced from its normal position on the abdominal floor, either to the left or to the right or into an anterior position. Practitioners and literature divide AD into 4 types (4).

1. In left displacement (LDA), a sac of the abomasum comes to lie in a position behind the omasum and to the left of the rumen. The greater curvature, which passes under the rumen, is impounded between the rumen and the left abdominal wall and lies in the left lower flank.

2. In anterior displacement (ADA), the clinical picture is very similar to that of left displacement but the abomasum, or the major part of it, is displaced anteriorly and comes to lie between the reticulum and the diaphragm.

3. In right displacement, the abomasum (RDA) is displaced to the right and is found lying between the liver and the right abdominal wall and, in severe cases, may extend as far backwards as the pelvic brim.

4. Torsion (volvulus) of the abomasum (AV) causes a syndrome of alimentary tract obstruction and, in its acute form, is manifested by severe abdominal pain and rapid death. Torsion occurs in a vertical plane and around a horizontal axis passing transversally across the body in the vicinity of omaso-abomasal orifice; viewed from the right, the torsion may be clockwise or anticlockwise.

#### *History of AD*

In 1898, Carougeau and Prestat (cit. 5) diagnosed the first case of abomasal torsion in a calf. In 1928 and 1930, Vink (6) described the first abomasal torsions in adult cows, and since then a gradually increasing number of abomasal torsions have been recorded. In 1943 and 1945 Emsbo (7, 8) reported an increasing incidence of abomasal torsions in Denmark and gave a detailed description of the disease. Løje (9, 10) diagnosed right-sided displacement of the abomasum for the first time using clinical laparotomy. The first cases of left-sided displacements of the abomasum were published by Begg (11), Begg and Whiteford (12) in the UK and the USA by Moor et al. (13). The end of the first period of history of abomasal displacement is marked by the detailed and comprehensive study by Dirksen (14, 15). Since then an avalanche of papers on abomasal displacement have been published. The first cases of abomasal

displacement in the former Yugoslavia were reported in 1962 by Blagojević and Novak (16), Horvat et al. (17) as well as Vulinec and Herceg (18). In 1965 Van de Watering et al. (55) observed the anterior dislocation of the abomasum.

Our clinic performed its first surgical correction of a displaced abomasum in 1969 (19) and by 1980 we had surgically treated another five displacements. Until 1998, Slovenia had only 9 written reports of abomasal displacements in cattle (19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27). I successfully diagnosed and carried out my first surgical treatment of right-sided displacement of the abomasum in 1981.

Table 1: Presentation of abomasal displacements from 1981 to 2001 at the Clinic for Ruminants in Ljubljana

Period	LDA <sup>1</sup>	RDA <sup>2</sup>	AV <sup>3</sup>	ADA <sup>4</sup>	Total AD <sup>5</sup>
1981 - 1990	22	10	4	0	36
1991 - 2001	100	16	25	20	161
Total	122	26	29	20	197

<sup>1</sup> = Left displacement of the abomasum; <sup>2</sup> = Right displacement of the abomasum; <sup>3</sup> = Abomasal volvulus; <sup>4</sup> = Anterior displacement of the abomasum; <sup>5</sup> = Abomasal displacement

Due to a significant increase in, both the incidence of the disease amongst our patients since 1995 and the number of written reports originating from Slovenia - there have been another nine since 1998 (19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27) - we have begun an extensive study of the problem.

### *Aetiology*

AD has been observed in adult dairy cows with increasing frequency in recent years. This may be due to an increase in the surgical treatment of chronic indigestion in cattle, which has led to incidental observations of abomasal displacements through the laparotomy incisions. On the other hand there is a general impression that the incidence of the disease has increased. This may be related to the heavy feeding of cows in late pregnancy with corn silage, grass silage and grain because market prices have stimulated farmers to high milk-production. Clinicians are of the opinion that the cause of displaced abomasum in cattle is multifactorial. The prerequisites for the development of the displacement are hypomotility, reflux of abomasal fluid and gaseous distension of the abomasum (35, 36, 37). The feeding of high levels of concentrates to dairy cattle causes a decrease in abomasal motility and the increased accumulation of abomasal gas. Abomasal hypomotility and emptying disorders could be due to the increased enteric inhibitory neuronal activity and the reduced cholinergic muscle response (38). Some authors have stated that endotoxins, prostoglandins and histamine have been shown experimentally to induce LDA (47).

### *Epidemiology*

In general, AD occurs in 1.75 % to 6.0 % of dairy cows worldwide (40, 41, 42). The mean rate of occurrence, measured over a number of years, in a cow population in Denmark was 0.62 %, with a range of 0.2 to 1.6 %. The lactational incidence risk

of LDA, for dairy herds in Ontario (Canada), is about 2 % (39). In Norway, 88 % of the abomasal displacements are left-sided and 12 % are right-sided (36).

### *Risk factors*

**Parturition.** Displacement of the abomasum occurs most commonly in large-sized, high-producing adult dairy cows immediately after parturition. About 90 % of displacements of the abomasum were diagnosed between one to three weeks postpartum. LDA occurs in about 75 % of cases as the abomasum migrates from the lower right side of the cow to the left side of abdominal cavity. RDA involves a twist or torsion on the right side, which can restrict blood and abomasal flow, and is more serious than LDA (36, 39, 40, 41, 42).

**High level of concentrate feeding.** The disease is common in the EU and North America, where dairy cattle are fed grain for high milk production and the animals are usually housed for part of the year or kept confined. The disease is uncommon in Australia and New Zealand, where much fewer concentrates are fed to dairy cattle and the animals are usually on pasture for most of the year.

**Breed and age.** AD is predominantly seen in Black & White dairy herds with an above-average milk yield and in cows between the ages of 4 and 7 years.

**Season of the year.** Higher incidence rates were observed in the winter and early spring months (41, 44).

**Concurrent diseases.** Concurrent diseases were present in 30 % of AV cases and in 54 % of LDA cases (36). In general, the cows suffered from negative energy balance, hypocalcaemia, lipidosis and ketosis (31, 41, 45, 46).

## **Materials and methods**

Our report is based on a study of 161 cows, which were clinically treated at our Clinic. The health data analysed included the history of the disease, results of clinical and laboratory examinations, surgical treatments and postoperative therapies.

### *Clinical examination*

Routine general clinical examinations of the cows (n = 161) were performed prior to a close examination of their gastrointestinal tract and abdomen (inspection of the contour, palpation, ballottement, simultaneous percussion and auscultation, and succussion). The body temperature (°C), heart and pulse rates (beats/min), respiratory rate (breaths/min), state of hydration, and ruminal movements, especially peripheral circulation including venous circulation, were examined.

The abdomen was examined by percussing with either a flick of the finger or, more reliably, with a plexor while simultaneously auscultating. The stethoscope was placed immediately adjacent to the area being percussed and the examiner listened for resonant sounds, which may vary from high-pitched bell-like sounds (pings) to low-pitched bass drum sounds (pungs). To elicit the diagnostic ping, it is necessary to

percuss and auscultate side by side, and to percuss with a quick, sharp, light and localized force.

All clinical diagnoses were later confirmed by a right laparotomy and all operations to correct the abomasal displacements were performed on the right paralumbar fossa, while the cows were standing, using the "Ljubljana method" - right percutaneous paralumbar fossa omentopexy (7, 8). We used paravertebral and local infiltration anaesthesia with 2 % lidocaine. We prefer not to use sedatives like Xylazine, because it slows the intestinal motility for a long time after surgery (53). A 25 cm long incision is made, beginning one hand below the lateral spinous process of the lumbar vertebrae and running craniodorsally to the caudoventral region, 5-fingers-width from the last rib. The abdominal cavity must be carefully opened to prevent injury to the distended and right-sided abomasum that lies directly under peritoneum. After a sterile cotton operating cuff is applied, the highest point of the abomasum is punctured by a cannula that is attached to a sterile rubber tube. The abomasal wall should be punctured tangentially in order to produce a long puncture wound that will seal itself, thereby preventing the leakage of abomasal contents. After being punctured, there is enough space in the abdominal cavity to perform a manual exploration.

#### *The surgical correction and postoperative care of RDA and AV*

A right-sided displacement with torsion requires immediate surgical interference. Based on the characteristic clinical signs (pings, pungs, ileus, colic, dehydration, toxemia and cardiac conditions) an accurate diagnosis is established. Before and during the surgery, fluids and electrolytes are usually administered intravenously. The procedure is carried out while the animal is standing. The laparotomy is performed on the right paralumbar fossa. A 25-cm skin incision is made 10 cm caudally, behind the costal arch. The abdominal cavity is protected, with sterile compresses, against contamination by abomasal contents. Palpating establishes the position of the abomasum and the direction and degree of the torsion. The abomasum is pulled into the wound and the fixation completed by an assistant. A concentric suture is applied to the abomasum and a small incision is made through the central part, into which a sterile nasal tube is pushed (a Newmann's nasal sound). The suture is then tightened, so that the gap between the tube and the edge of abomasal wound is closed. The abomasal contents, gas and fluids, are removed via the nasal tube, whereupon it is pulled out and the incision wound is tied using a concentric suture. Any torsion present is corrected and the abomasum replaced in its normal position. Postoperative care consists of the administration of fluids, electrolytes, glucose and antibiotics. Dietary measures, the administration of linseed broth with digestives via a stomach tube, are observed for several days.

#### *The surgical correction and postoperative care of LDA and ADA*

With LDA, and ADA, the abdomen is opened from the right side, behind the costal arch. The left arm is stretched along the greater omentum and craniodorsally across the rumen, to the left costal arch, where the dislocated abomasum is palpated.

Generally the abomasum is palpated like a large inflated tube. The gas-filled abomasum is displaced under the rumen and becomes trapped between the left abdominal wall and the rumen. A cannula, 2 to 3 mm in diameter, is affixed to a rubber tube (150 cm) and inserted into the abomasum. After the gas is released, the cannula is removed. The right hand is moved cranioventrally, along the right abdominal wall, to the omasum. The abomasum is then drawn to the right side of the abdomen and the pylorus drawn into the wound. Thereafter, the omentopexy is performed near sow's ear in the greater omentum. The procedure is described under the heading Right percutaneous paralumbar fossa omentopexy using the "Ljubljana method".

Of the 20 cows where ADA was established during the operation three were slaughtered immediately after surgery because of perforated abomasal ulcers. One animal with LDA relapsed five days after surgery. It was again operated on and it was established that omentum had torn away from the fixation suture. No severe postoperative peritonitis, due to omentopexy, was ever established.

#### *Right percutaneous paralumbar fossa omentopexy using the "Ljubljana method"*

Omentopexy is performed with LDA, RDA, AV and ADA. Until 1993, omentopexy was not carried out on right-sided displacements and torsions. We began using fixation for all types of RDA, because of the numerous relapses. As Dirksen reported (14, 15, 65), LDA began to be surgically corrected in the region of the right paralumbar fossa. After the replacement of the abomasum, the omentopexy is performed near to the pylorus. The omentum is sutured to the right abdominal wall, 5 cm from the pylorus' so called "sow's ear" area in the greater omentum. Right percutaneous paralumbar fossa omentopexy is done using a Gerlach needle and a silk ribbon. The abdominal wall is perforated twice ca. 5 to 10 cm beneath the incision wound, at the level of the knee joint. For omentopexy, we use a 50 cm long, and 1 cm wide, silk ribbon, usually used for vaginal prolapse. The omentum is positioned and attached to the abdominal wall. Thereafter both ends of the ribbon are tightened and tied. The fixation suture is removed 8 to 10 days following the operation (26).

Blood samples: We carried out a haematological analysis (E, Hb, Ht, MCV, WBC, diff WBC) with a Coulter Counter ZF6 and biochemical sera analysis (Ca, iP, Mg, Na, K, Cl, AST, LDH, GLDH, GGT, total Bilirubin, Cholesterol, Glucose, Urea, BHB, FFA) with a Cobas Mira analyser.

Statistical evaluation: The accumulated data were statistically processed by an SPSS programme (5).

## **Results and Discussion**

During the period 1991 to 2001, we surgically treated 161 cases of AD. Table 1 shows that the incidence of AD in our clinic has been constantly increasing. From the data gathered, it is also evident that the 12.4 % incidence of ADA is, with respect to other types of AD, rather high. This information is important, especially for less experienced practitioners, who now must also consider the possibility of ADA



formation besides stubborn indigestion, during the periparturient period. Through owner reports and analysis of the data, it was established that it is only after the surgery that the cows gave the expected quantity of milk. Undiagnosed cases of ADA usually reach a certain level of inanition and may remain in equilibrium for several months. Milk production decreases to a small volume and the animal becomes thin, with its abdomen greatly reducing in size. A reduction in the bulk of faeces, a decrease in feed intake and permanent mild ketosis are great clinical pointers.

Table 2: Presentation of AD incidence from 1991 to 2001 at the Clinic for Ruminants in Ljubljana

Period	TOTAL AD	LDA	RDA	AV	ADA
1991	6 (3.7 %)	3 (50 %)	2 (33.3 %)	1 (16.7 %)	0
1992	3 (1.9 %)	3 (100 %)	0	0	0
1993	1 (0.6 %)	0	0	1 (100 %)	0
1994	11 (6.8 %)	9 (81.8 %)	1 (9.1 %)	1 (9.1 %)	0
1995	4 (2.5 %)	2 (50 %)	1 (25 %)	1 (25 %)	0
1996	27 (16.8 %)	18 (66.7 %)	2 (7. %)	2 (7.4 %)	5 (18.5 %)
1997	24 (14.9 %)	16 (66.7 %)	3 (12.5 %)	4 (16.7 %)	1 (4.2 %)
1998	39 (24.2 %)	23 (59.0 %)	4 (10.3 %)	7 (17.9 %)	5 (12.8 %)
1999	12 (7.5 %)	7 (58.3 %)	1 (8.3 %)	2 (16.7 %)	2 (16.7 %)
2000	34 (21.1 %)	19 (55.9 %)	2 (5.9 %)	6 (17.6 %)	7 (20.6 %)
Total	161 (100 %)	100 (62.1 %)	16 (9.9 %)	25 (15.5 %)	20 (12.4 %)

Table 3: Presentation of some data on AD history

Type of AD	Number of cows	Breed			Season Winter	Physiological status of cows					
		Black & White	Brown	Cross breed		1	2	3	4	5	6
LDA	100	95 %	2 %	3 %	60 %	17 %	53 %	23 %	2 %	4 %	1 %
RDA	16	87.5 %	12.5 %	0 %	50.2 %	12.5 %	56.3 %	25 %	0 %	6.2 %	0 %
AV	25	96 %	0 %	4 %	64 %	28 %	40 %	16 %	16 %	0 %	0 %
ADA	20	95 %	5 %	0 %	70 %	25 %	20 %	15 %	5 %	35 %	0 %
Total	161	94.4 %	3.1 %	2.5 %	63.4 %	19.3 %	47.2 %	21.1 %	4.3 %	7.5 %	0.6 %

<sup>1</sup>Winter months from November till June; 1 = 0 to 7 d postpartum (pp); 2 = 8 to 21 d pp; 3 = 22 to 90 d pp; 4 = > 90 d pp; 5 = 7 to 9 months of pregnancy; 6 = heifers Table 3 shows that the ratio of LDA + RDA + AV to ADA

Table 3 shows that the ratio of LDA + RDA + AV to ADA cases was 7.1 to 1. Black & White cows were at a higher risk of developing all types of AD than other breeds. In our environment the incidence of AD, especially ADA, was highest in the winter season. Although parturition appears to be the most common precipitating factor, the disease occurs throughout the year independently of the incidence of parturition. On the basis of our findings, it was established that 35% cases of ADA occurred during late pregnancy. Other types of AD occurred during the first three weeks after parturition - 53 %, 56.3 %, 40 % respectively. The risk of developing any type of AD increased with age, with the greatest risk at 4.0 to 5.5 years of age. The youngest cows had a higher risk of developing ADA (Table 4), which also showed



the longest period ( $10.5 \pm 13.5$  days) between the first recognisable signs to the confirmed diagnosis. In ADA the clinical findings are more or less similar to those described above, except that the characteristic LDA pings cannot be elicited in the area of the abdominal wall, between the upper third of the 9th and 13th ribs. In our study we detected a combination of "ping" and "pung" effects in 55.6 % of the cases of ADA, just behind the limits of percussible heart and lung area, in the left caudoventral, and right lateral, abdominal region. Of our 25 cows with AV, 40 % died. However, in the cows with ADA there were, statistically, significantly fewer deaths (15 %). Our experience has shown that diseases of the wall of the abomasum (secondary ulcers) and fatty liver are commonly concurrent in cows with ADA.

Table 4: Mean age of cows, mean time from first signs of the disease to surgical treatment, frequency of ping effect, and percentage of successful treatments in cows with AD

Type of DA	Number of cows	Mean age $\pm$ SD/year	Mean time/ days from first signs <sup>1</sup>	Frequency of ping effect %	Success of therapy	
					Survivals %	Deaths %
LDA	100	4.2 $\pm$ 1.8	8.7 $\pm$ 5.8	92.9	91.9	8.1
RDA	16	5.5 $\pm$ 2.8*	6.1 $\pm$ 4.5	93.3	93.8	6.3
AV	25	4.9 $\pm$ 1.9	7.2 $\pm$ 6.7	95.8	60	40***
ADA	20	4.0 $\pm$ 1.2	10.5 $\pm$ 13.5	55.6***	85	15
Total	161	4.4 $\pm$ 1.9	8.5 $\pm$ 7.2	89.1	86	13.8

<sup>1</sup>Mean time/days from first signs of DA to surgical treatment; \*\*\*P < 0.001

It was established that Ca, K, Na, Cl,  $\beta$ -hydroxybutyrate, FFA and serum AST, GGT, GLDH activity were not convincing preoperative laboratory diagnostic indicators in cows with ADA. As there was no interference with the blood supply to the trapped portion of the abomasum, the effects of the displacement in the ADA cases, were entirely those of interference with the digestion and movement of the ingesta, leading to a state of stubborn indigestion, ketosis and lipomatosis. The high diagnostic value of total sera bilirubin, in cows with ADA, is the result of a partial bile duct obstruction. On the basis of our findings relatively high but statistically significantly low activity of AST, GGT and GLDH in cows with ADA was established with respect to cows with other types of AD which was associated with mildly increased degrees of liver lipidosis.

Ketosis and fatty liver were the most common complications of ADA. We detected an increased, but not significantly high, level of FFA and BHB in cows with ADA.

Geishauser et al. (62) stated and concluded that the blood levels of AST and BHB in the first two weeks p.p. might be used as indicators for a subsequent LDA. As Glucose, Ca and urea were either not significantly associated with LDA or were only significantly associated in the second week p.p. this may limit their usefulness as tests for LDA. Itoh et al. (63) observed an increase in AST, GGT, VFA and BHB in the blood of cows with LDA.

Table 5: Some important, and statistically significant, mean values and the  $\pm$  SD of blood parameters in our cows with AD

Parameters	LDA N = 100	RDA n = 16	AV n = 25	ADA n = 20	Total n = 161
Ht (L/L)	0.319 $\pm$ 0.05	0.327 $\pm$ 0.04	0.339 $\pm$ 0.06	0.329 $\pm$ 0.06	0.325 $\pm$ 0.05
Neutrophils (%)	47.6 $\pm$ 19.1	45.7 $\pm$ 16.4	64.7 $\pm$ 14.2	52.5 $\pm$ 16.0	50.7 $\pm$ 18.7
Ca (mmol/L)	2.14 $\pm$ 0.23	2.13 $\pm$ 0.15	2.17 $\pm$ 0.26	2.20 $\pm$ 0.18	2.15 $\pm$ 0.21
Na (mmol/L)	140.2 $\pm$ 4.1	138.8 $\pm$ 3.5	138.9 $\pm$ 5.9	141.4 $\pm$ 6.4	140 $\pm$ 4.7
K (mmol/L)	3.9 $\pm$ 0.6	3.9 $\pm$ 0.5	3.8 $\pm$ 0.8	4.0 $\pm$ 0.8	3.9 $\pm$ 0.7
Cl (mmol/L)	96.5 $\pm$ 7.7	96.7 $\pm$ 5.3	91.6 $\pm$ 12.1	99.5 $\pm$ 8.7	96.2 $\pm$ 8.6
Tot.Bili.( $\mu$ mol/L)	19.7 $\pm$ 9.6	20.2 $\pm$ 7.6	15.6 $\pm$ 8.5	19.0 $\pm$ 9.3	19.1 $\pm$ 9.3
Gluc. (mmol/L)	4.53 $\pm$ 2.20	3.66 $\pm$ 0.61	5.92 $\pm$ 3.08	4.67 $\pm$ 1.74	4.71 $\pm$ 2.79
BHB (mmol/L)	1.96 $\pm$ 1.418	1.09 $\pm$ 0.408	0.614 $\pm$ 0.449	1.01 $\pm$ 0.867	1.47 $\pm$ 1.273
AST (Units/L)	122 $\pm$ 83.9*	148 $\pm$ 102.4	180 $\pm$ 128.6	128 $\pm$ 89.2	134 $\pm$ 95.7
GGT (Units/L)	32.9 $\pm$ 30.9	27.0 $\pm$ 13.3	78.7 $\pm$ 43.1	27.8 $\pm$ 15.1*	39.5 $\pm$ 34.8
GLDH (Units/L)	51.7 $\pm$ 103.3	67.4 $\pm$ 34.3	154.1 $\pm$ 127.6	19.8 $\pm$ 21.1*	65.4 $\pm$ 104.1
FFA (mmol/L)	1.82 $\pm$ 0.725	1.58 $\pm$ 0.505	0.98 $\pm$ 0.616	1.35 $\pm$ 0.799	1.57 $\pm$ 0.763
Urea (mmol/L)	6.14 $\pm$ 3.25	6.17 $\pm$ 3.97	11.51 $\pm$ 8.35**	4.96 $\pm$ 2.33	6.83 $\pm$ 4.86

\*P &lt; 0.05; \*\*P &lt; 0.001

The "ping effect" was established in 89.1 % of cases. The simultaneous auscultation and percussion method proved very accurate, nearly 100 %, in detecting RDA, but less so in ADA (55.6 %). It was assumed that the characteristic ping sound in LDA and or RDA was caused by the quick course of the disease. The pitch, intensity and range of the ping effect varied with regard to the type and degree of dislocation. The greatest range (35+ cm in diameter) of the ping effect was established in RDA with torsion and LDA. In the area of the "ping", the characteristic abomasal tinkling sounds were heard in 93.3 % of the cases; most frequently in RDA and LDA and least frequently, and irregularly, in ADA. We found that both auscultation and a combination of auscultation and percussion (flicking) were reliable and effective examination methods for cows affected with RDA and LDA. Both techniques are non-invasive and require no special, or expensive, equipment. The method, however, requires that clinicians need to be experienced and painstaking in their examinations. The use of invasive diagnostic methods can be associated with complications such as infection of the abdominal wall. More efficient methods of diagnosing all types of AD need to be developed, e.g. the determination of pepsinogen in the blood, or faecal blood, as an indicator of affected abomasal mucosa (65).

The mean values of pulse rate respiration and ruminal movements deviated from normal values. Table 6 shows that the mean value of temperature (T) was the most constant and only increased slightly with LDA.

Table 6: Mean values of temperature (T), pulse rate (P), respiration rate (R) and number of ruminal movements (Rm)

Type of DA	Number of cows	Mean T ± SD/ °C	Mean P ± SD/min	Mean R ± SD/min	Mean Rm ± SD/5 min
LDA	100	39.1 ± 0.84	91.9 ± 16.2	27.5 ± 11.8	3.7 ± 2.9
RDA	16	38.9 ± 0.49	82.0 ± 7.6	28.8 ± 6.4	7.5 ± 0.7
AV	25	38.5 ± 0.35	101.7 ± 13.8	18.1 ± 7.5	3.7 ± 3.1
ADA	20	38.9 ± 0.34	96.4 ± 12.0	40.1 ± 22.8	4.0 ± 3.0
Total	161	38.9 ± 0.49	92.8 ± 15.6	31.1 ± 11.9	4.7 ± 3.1

The increased temperature values could be due to septicaemia accompanying concurrent parturition diseases, such as metritis, mastitis and peritonitis. The mean values of the respiration rate are within the normal range, with the exception of ADA where the deviation is probably due to the increased pressure of the dilated abomasum on the diaphragm. In all displacements, the mean pulse value was above normal and was highest in AV due to the disturbed circulation and metabolic alkalosis. The ruminal contractions in RDA, on the other hand, were within the normal range and were, comparatively, less frequent and weak than other dislocations.

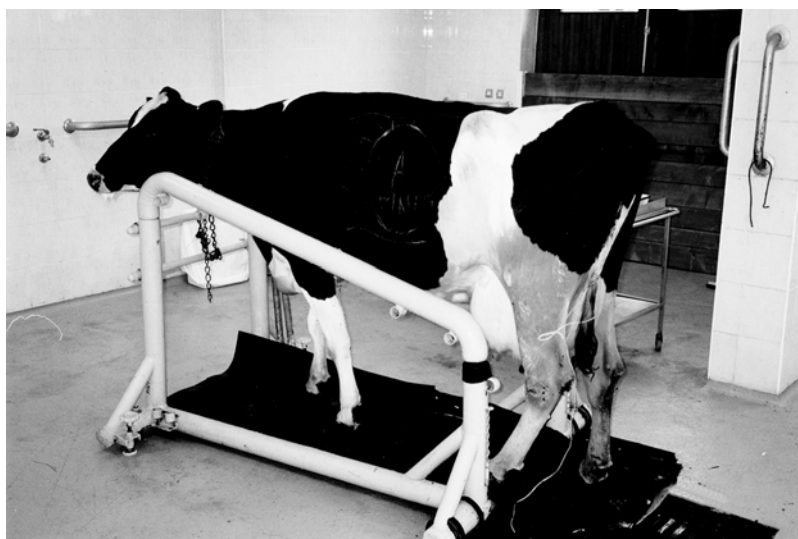


Figure 1: Left lateral aspect of the abdominal region of a cow with a left-side displacement of the abomasum; ping and pung effect over left abdominal cavity



Figure 2: Percussions and simultaneous auscultation of left or right abdomen to elicit pings or pungs or fluid-splashing sounds, which indicate that fluid and gas are in the distended abomasum



Figure 3: Omentopexy is performed in the greater omentum about one hand width caudally to the pylorus



Figure 4: We recommend a Gerlach needle and a silk ribbon, 50 cm long and 1 cm wide, usually used for vaginal prolapse

### Conclusion

For an accurate diagnosis of AD, the establishment of the "ping" and "pung effect" is of great importance. A definitive interpretation of the ping effect is possible, however, only in combination with the other examination methods described and laboratory blood, urine, and milk tests. The established ping effect, presence of ketones and the occurrence of the disease within the postpartum period, provide good diagnostic data for surgical interference.

Our findings revealed that the 12.4 % incidence of ADA was high with respect to the other types of DA. Our experience has shown that ADA may be characterized as a special type of abomasal displacement. An early and accurate diagnosis of ADA is very important for the production and good health of dairy cows. Practitioners should be careful when making the diagnosis because cows which show stubborn indigestion, ketosis and fatty liver during the periparturient period may suffer from ADA. It has been established that quite a lot of our colleagues are not very well acquainted with the diagnosis, treatment and prevention of AD. Many make a wrong diagnosis and sometimes the disease is misinterpreted as either stubborn ketosis or other postparturient diseases. In all 161 cases, the displaced abomasum was repositioned and the omentopexy was performed using our own modified method, i.e. 5 cm away from pylorus. The "Ljubljana method" used for the fixation of the abomasum is simple, reliable and cost effective.

### Zaključek

Za pravilno diagnozo dislokacije siriščnika je ugotovitev učinka "ping in pong" velikega pomena. Za dokončno potrditev tega učinka moramo opraviti še druge klinične in laboratorijske teste krvi, urina in mleka. Ugotovljena ping efekt in prisotnost ketonov sta dobri diagnostični znamenji za kirurško intervencijo.

Na osnovi rezultatov smo ugotovili, da je bila 12,4% pojavnost prednje dislokacije siriščnika (ADA) visoka, glede na druge tipe dislokacije. ADA lahko zaradi tega uvrstimo v samostojno obliko dislokacije siriščnika. Zgodnja in pravilna diagnostika ADA je zelo pomembna za optimalno proizvodnjo in zdravje krav. Menimo, da morajo biti kliniki pri pregledu živali v obporodnem obdobju, ki kažejo znamenja trdovratnih prebavnih motenj, ketoze in mastne infiltracije jeter, previdni, saj imajo krave lahko tudi ADA. Ugotovili smo, da veliko kolegov ni dovolj seznanjenih z diagnostiko, zdravljenjem in preventivo dislokacije siriščnika. Mnogi celo postavijo napačno diagnozo in zdravijo krave za trdovratno ketozo in druge poporodne bolezni. Pri vseh tipih dislokacije smo po naravnavi siriščnika opravili omentopeksijo 5 cm od pilorusa, in sicer po naši modificirani metodi. Ljubljanska metoda omentopeksije, ki se uporablja za učvrstitev siriščnika, je preprosta, poceni in zanesljiva.

### Acknowledgements

This work was done under the CEEPUS scholarship programme at The Clinic for Ruminants in Ljubljana, 3 May - 31 May 2000

### References

1. Phillips CJC. Principles of cattle production. Wallingford, CABI Publishing: 2001: 29.
2. Snoep JJ. What are the veterinarians to expect with respect to clinical chemistry in relation to veterinary herd health farms in next 10 years. Veterinary samples exchange meeting. Utrecht, 2000.
3. Massey CD, Wang C, Donovan A, Beede DK. Hypocalcemia at parturition as risk factor for left displacement of the abomasum in dairy cows. J Am Vet Med Assoc 1993; 203: 852-3.
4. Blood DC, Henderson JA. Veterinary medicine. London; Bailliere, Tindall; Cox: 1963: 143-8.
5. Breukink HJ. Abomasal displacement, etiology, pathogenesis, treatment and prevention. Bov Practit 1991; 26: 148-53.
6. Vink HH. Torsio abomasi hos kvaaget. Tijdschr Diergeneesk 1930; 57: 783.
7. Emsbo P. Lobetorsion hos kvaaget. Medlemsbl. Danske. Dyrlegeforen 1943; 26: 181.
8. Emsbo P. Lobetorsion hos kvaaget. Medlemsbl. Danske. Dyrlegeforen 1943; 28: 128.
9. Løje K. Torsio abomasi hos kvageget. Mann for Dyr. 1945; 75: 85.
10. Løje K. Torsio abomasi beim Rind mit besonderem Hinblick auf die Diagnose und Therapie. Medlemsbl. Danske Dyrlegeforen 1948; 57: 85.
11. Begg H. Diseases of the stomach of adult ruminant. Vet Rec 1950; 62: 797.
12. Begg H, Whiteford WA. Displacement of abomasum in the cow. Vet Rec 1956; 68: 122-5
13. Moore GR, Riley WF, Westcott RW, Conner GH. Displacement of the bovine abomasum. Vet Med 1954; 49: 49.
14. Dirksen G. Vorkommen, Ursachen und Entwicklung der linksseitigen Labmagenverlagerung (Dislocatio abomasi sinistra) des Rindes. Dtch Tierärztl Wschr 1961; 68: 8.
15. Dirksen G. Erweiterung, Verlagerung und Drehung des Labmagens beim Rind. Berlin: Hamburg, 1962.
16. Blagojević S, Novak I. Dislokacija sirišta kod goveda. Vet Arh 1962; 32: 296.
17. Horvat V, Brezovac S, Martinec J, Branilović I, Lukman P. Slučaj kirurške terapije zavrnuća sirišta u krave. Vetserum 1969; 17: 42.



18. Vulinec M, Herceg M. Slučaj dislokacije i torzije sirišta u desnu stranu kod goveda. *Vet Arh* 1969; 39: 148.
19. Skušek F, Gregorović V, Jazbec I. Desna a zatim lijeva dislokacija sirišta u jedne krave. *Vet Glasn* 1970; 24: 285.
20. Dolenc A. Utjecaj izhrane na pojavu dislokacije sirišta u visoko proizvodnih krava muzara. In: 5. savetovanje o diagnostici, profilaksi i terapiji u savremenoj stočarskoj proizvodnji. Primošten, 1979: 68.
21. Zadnik T, Jazbec I, Skušek F, et al. Dislokacija sirišnika pri govedu. *Vet Nov* 1989; 15: 151.
22. Zadnik T, Jazbec I, Skušek F, et al. Dislokacija sirišta kod goveda. *Vet Glasn* 1989; 43: 803.
23. Zadnik T, Modic T. "Ping effect pri molznicah". In: 1. slovenski veterinarski kongres. Portorož, 1993. (1): 195.
24. Zadnik T, Modic T. Diagnosis and surgery of displacement of the abomasum in dairy cows in Slovenia. *Bov Practit* 1995; 29: 86-7.
25. Mesarič M, Zadnik T, Modic M. Ping effect: a differential diagnosis of abdominal diseases in dairy cattle. In: the 2nd Slovenian veterinary congress. Slovenian Veterinary Association, Rogaška Slatina 1997: 1398.
26. Modic T, Zadnik T, Mesarič M. Omentopexy of a displaced abomasum carried out via the Ljubljana method. In: 5th Atti del congresso della federazione Mediterranea sanita e produzione ruminanti. Bologna, 1997: 197.
27. Mesarič M, Zadnik T, Modic T. Clinical diagnosis of abomasal displacement in dairy cows. In: 5th Atti del congresso della federazione Mediterranea sanita e produzione ruminanti. Bologna, 1997: 203.
28. Oetzel GR. Ammonium chloride and ammonium sulfate for parturient paresis in dairy cows. *J Dairy Sci* 1988; 71: 3302-9.
29. Beede DK, Risco CA, Donovan GA, Wang C, Archbald LF, Sanchez WK. Nutrition management of the late pregnant dry cow particular reference to dietary cation-anion difference and calcium supplementation. *Bov Practit* 1992; 24: 51-5.
30. Block E. Manipulation of dietary cation-anion difference in nutritional related production diseases, productivity, and metabolic responses of dairy cows. *J Dairy Sci* 1994; 77: 1437-50.
31. Massey CD, Wang C, Donovan GA, Beede DK. Hypocalcemia at parturition as a risk factors for left displacement of abdomen in dairy cows. *J Am Vet Med Assoc* 1993; 203: 852-3.
32. Huber TL, Wilson RC, Stattelman AJ, Goetsch DD. *Am J Vet Res* 1981; 42: 1488-90.
33. Risco CA, Reynolds JP, Hird D. Uterine prolapse and hypocalcemia in dairy cows. *J Am Vet Med Assoc* 1984; 185: 1517-20.
34. Oetzel GR. Use of anionic salts for prevention of milk fever in dairy cattle. *Comp Cont Educ* 1993; 15: 1138-1146.
35. Constable PD, Miller GY, Hoffsis GF, Hull BL, Rings DM. Risk factors for abomasal volvulus and left abomasal displacement in cattle. *Am J Vet Res* 1992; 53: 1184-92.
36. Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. *Veterinary medicine*. 8th ed. London, Saunders: 1999: 320.
37. Breukink HJ, Kuiper R. Digestive disorders following obstruction of flow of ingesta through the abomasum and small intestine. *Bov Practit* 1980; 15: 139.
38. Reiche D, Geishouser T, Schemann M. Displaced abomasum: Physiology and pathophysiology of the abomasal motility. In: *Aetiologie, Pathogenese, Diagnostik, Prognosen, Therapie und Prophylaxe der Dislocatio abomasi*. Leipzig: Universitätsverlag, 2000: 17-27.
39. Geishouser T, Leslie K, Duffield T, Edge V. An evaluation of milk ketone tests for prediction of left displaced abomasum in dairy cows. *J Dairy Sci* 1997; 80: 3188-92.
40. Geishouser T. Abomasal displacement in the bovine: a review of character, occurrence, etiology and pathogenesis. *J Vet Med* 1995; A 42: 229-51.
41. Zadnik T. A review of abomasal displacement in Slovenia. In: *XXth World Buiatrics Congress, Proceedings Vol. 1*. Sydney, 1998; 115-21.
42. Zadnik T, Mesarič M, Klinkon M. A review of abomasal displacement in Slovenia and omentopexy carried out via the Ljubljana method. In: *Proceeding of the Middle-European Congress for Buiatrics*. Balatonfured, 1999: 33-40.
43. Poike A, Furl M. Epidemiology of displaced abomasum in Germany. In: *Aetiologie, Phatogenese, Diagnostik, Prognose, Therapie und Prophylaxe der Dislocatio abomasi*. Leipzig: Universitätsverlag, 2000: 29-41.



44. Karatzias H. Epidemiology of abomasal displacement in dairy cows in Greece. In: Aetiologie, Pathogenese, Diagnostik, Prognose, Therapie und Prophylaxe der Dislocatio abomasi. Leipzig: Universitätsverlag, 2000: 73-80.
45. Veenhuizen JJ, Drackley JK, Richard MJ, Sanderson TP, Miller LD, Young JW. Metabolic changes in blood and liver during development and the treatment of experimental fatty liver and ketosis in cows. *J Dairy Sci* 1991; 74: 4238-53.
46. Breukink HJ, Wensing T. Pathophysiology of the liver in high yielding dairy cows and its consequences for health and production. *Israel Vet Med* 1997; 52: 66-71.
47. Fürll M et al. Interactions between fat metabolism and endotoxins in cows and their significance for abomasal displacement. In: Proceeding of the XXth World Buiatrics Congress. Sydney, 1998; 1: 524.
48. Zadnik T, Mesarič M. Fecal blood levels and serum proenzyme pepsinogen activity of dairy cows with abomasal displacement. *Israel J Vet Med* 1999; 54(3): 61-5.
49. Vlamick L, Martens A, Steenhaut M, Gasthuys F, Desmet P, De Moor A. Surgical correction of abomasal displacement in cows: a review of 163 cases. *Cattl Pract* 1996; 4: 201-7.
50. Barret DC. Abdominal surgery workshop: left displaced abomasum. *Cattl Pract* 1998; 6(1): 37-40.
51. Hull BL. Differential diagnosis of the right sided "Ping". *Bov Practit* 1982; 17: 72-74.
52. Kümper H. The surgical treatment of right displaced abomasum and abomasal volvulus in cattle: 462 cases (1989 - 1994). In: Proceeding of the XIXth World Buiatrics Congress. Edinburgh, 1996; (2) 671-4.
53. Doherty TJ, Hancock AA. Role of alfa2 - adrenergic receptors in the control of diarrhoea and intestinal motility. *J Pharmacol Exp Ther* 1983; 225: 269-74.
54. Müller KE. Some aspects of pathogenesis and therapy of abomasal displacement in cattle. *Cattl Pract* 1998; 6: 41-5.
55. Van de Watering CC, et al. Een geval van labmaagdilatatie en dislokatie naar cranial. *Tijdschr Diergeneeskd* 1965; 21: 1478-82.
56. Hull BL. Closed suturing technique for correction of left abomasal displacement. *Iowa State Vet* 1972; 34: 142-144.
57. Hofmann W. Critical comparison of different therapeutical interventions in abomasal displacement in cows. In: Aetiologie, Pathogenese, Diagnostik, Prognoses, Therapie und Prophylaxe der Dislocatio abomasi. Leipzig: Universitätsverlag, 2000: 197-202.
58. Kheler P, Heimberg P, Scholz H. Clinical study on a modified percutaneous abomasopexie (according to Sterner and Grymer) for the treatment of left displacement of the abomasum in cows. In: Aetiologie, Pathogenese, Diagnostik, Prognoses, Therapie und Prophylaxe der Dislocatio abomasi. Leipzig: Universitätsverlag, 2000: 203-38.
59. Grymer J, Sterner KE. Percutaneous fixation of left displaced abomasum using a bar suture. *J Am Vet Med Assoc* 1982a; 12: 1458-61.
60. Fleischer P, Šlosarkova S. Experiences in abomasal displacement and bar suture (Grymer - Sterner) in Czech republic. In: Aetiologie, Pathogenese, Diagnostik, Prognoses, Therapie und Prophylaxe der Dislocatio abomasi. Leipzig: Universitätsverlag, 2000: 239-247.
61. Janowitz H. Laparoscopic reposition and fixation of the left displaced abomasum in cattle. In: Aetiologie, Pathogenese, Diagnostik, Prognoses, Therapie und Prophylaxe der Dislocatio abomasi. Leipzig: Universitätsverlag, 2000: 249-53.
62. Geishauser T, Leslie K, Duffield T, Sandals D, Edge V. The association between selected metabolic parameters and left abomasal displacement in dairy cows. *J Vet Med* 1998; A 45: 499-511.
63. Itoh N, Kiwa M, Hatsugaya A, Yokota H, Taniyama H, Okadsa H, Kudo K. Comparative analysis of blood chemical values in primary ketosis and abomasal displacement in cows. *J Vet Med* 1998; A 45: 293 - 298.
64. Fürll M, Krüger M. Alternatives for prophylaxis of abomasal dislocation in cattle. *Prakt Tierarzt Coll Vet* 1999; 29: 81-90.
65. Radostits OM, Mayhew IG, Houston DM. Veterinary clinical examination and diagnosis. London: Saunders, 2000: 429.
66. Dirksen G. Gegenwärtiger Stand der Diagnostik, Therapie, und Prophylaxe der Dislocatio abomasi sinistra des Rindes. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 1981; 66: 65-71.
67. Brand A, Noordhuizen JPTM, Schukken YH. Herd health and production management in dairy practice. Wageningen Pers 1996.

**T3 IN T4 V KRVNEM SERUMU, NEKATERI ELEMENTI V PERJU IN  
IZTREBKIH TER VIŠINA VRHNJICE NA GLAVI PRI PAPIGI  
SKOBČEVKI (*Melopsittacus undulatus*) PO TRETIRANJU Z L-T4 IN TRH**

Z. GOLOB

Ključne besede: veterinarska medicina; koža; perje; iztrebki; T3; T4; J; Se; papiga skobčevka

V glavni poskus je bilo vključenih 64 šest do osem mesecev starih papig skobčevk (*Melopsittacus undulatus*); 26 je bilo tretiranih z visokimi dozami tiroksina (L-T4 1000  $\mu\text{g kg}^{-1}$  t. t.; Vobenol, LEK Ljubljana), 38 pa je bilo kontrolnih. Naknadno, tj. po 25 dneh, je sedem tretiranih in dvanajst kontrolnih živali prejelo TRH (VEB Berlin-Chemie, Nemčija) v dozi 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , in sicer trikrat tedensko deset tednov zapored. Merili smo vrednosti T3 in T4 v krvnem serumu in višino vrhnjice z glave v obdobju september - december. Tretiranje z L-T4 je pospešilo odstranjevanje peres med golitvijo (tj. v septembru). Visoke vrednosti T3 in T4 v krvnem serumu živali, tretiranih z L-T4, so hitro upadle po prekinitvi tretiranja od 5. oktobra do 24. novembra in so se v decembru izenačile s tistimi pri kontrolnih živalih. Povprečna višina vrhnjice pri živalih, tretiranih z L-T4, je bila največja v oktobru ( $8,69 \pm 0,41 \mu\text{m}$ ), z vrednostmi pri kontrolnih živalih pa se je skoraj izenačila v novembru. Pri kontrolnih živalih sta bili ugotovljeni večji vrednosti ščitničnih hormonov v krvnem serumu septembra in decembra. Prvi primer je bil povezan z golitvijo, drugi pa domnevno s padcem temperature v prostoru z živalmi z 20 na 13 °C. Vrhnjica glave je bila pri kontrolnih živalih debelejša med golitvijo ( $6,79 \pm 0,17 \mu\text{m}$ ) kot v decembru ( $4,28 \pm 0,35 \mu\text{m}$ ), kar posredno kaže na to, da je dvig ščitničnih hormonov v septembru specifično povezan z regeneracijo peres. Dodatno smo vključili v poskus 16 živali, od katerih je bilo 8 kontrolnih in 8 tretiranih z L-T4 500  $\mu\text{g kg}^{-1}$  t. t. 16 dni zapored. Doza je učinkovito spodbudila golitev in ni bila toksična v primerjavi z dozo 1000  $\mu\text{g kg}^{-1}$  t. t. TRH je spodbudil ščitnice tako pri kontrolnih živalih kot tudi pri tistih, ki so imele zaradi tretiranja z L-T4 zelo zavrto ščitnično aktivnost.

---

Delo je prispelo: 1. julija 2001

Naslov avtorja: dr. Zlatko Golob, dr. vet. med., Golob, d.o.o., Glavni trg 7, 2366 Muta.

Citirati: Golob Z. T3 and T4 blood serum concentrations, some elements in plumage and excrements, and head epidermis height in the budgerigar (*Melopsittacus undulatus*) after treatment with L-T4 and TRH. Slov Vet Res 2001; 38 (3): 209-17.

**T3 AND T4 BLOOD SERUM CONCENTRATIONS, SOME ELEMENTS IN PLUMAGE AND EXCREMENTS, AND HEAD EPIDERMIS HEIGHT IN THE BUDGERIGAR (*Melopsittacus undulatus*) AFTER TREATMENT WITH L-T4 AND TRH**

Key words: veterinary medicine; skin; feathers; excrement; T3; T4; J; Se; budgerigar

In the main experiment 64 six to eight-month-old budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) were included; 26 of them were treated with high doses of L-T4 (1000  $\mu\text{g kg}^{-1}$  b.w., 25 days successively; Vobenol, LEK Ljubljana, Slovenia) and 38 were controls. Subsequently, i.e. after 25 days, seven of the treated and twelve of the control animals received TRH (VEB Berlin-Chemie, Germany) in a dose of 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$  b.w., three times weekly, ten weeks successively. The blood serum T3 and T4 values, as well as the head epidermis height were recorded during the period September - December. L-T4 treatment accelerated the elimination of feathers during moult (in September). The high T3 and T4 blood serum values in animals treated with L-T4 decreased when treatment was omitted, from October 5 to November 24, and did level with the values of nontreated animals in December. The highest average epidermis height in L-T4 treated animals was in October ( $8.69 \pm 0.41 \mu\text{m}$ ). It almost leveled with the average value of control animals in November. In control animals the serum thyroid hormones had higher values twice, in September and December. The first increase was linked to the moult and the second one presumably to a drop in the room temperature to 13 °C. The head epidermis in control animals was significantly higher during moult ( $6.79 \pm 0.17 \mu\text{m}$ ) than in December ( $4.28 \pm 0.35 \mu\text{m}$ ). TRH treatment activated the thyroid glands in control animals, as well as in the animals with highly suppressed thyroid gland activity due to the L-T4 treatment. Additionally, 16 animals were included in the experiment; 8 of them were controls and 8 treated with L-T4 500  $\mu\text{g kg}^{-1}$  b.w., 16 days successively. The dose was efficient with regard to the promotion of feather loss and nontoxic in comparison to the dose of L-T4 1000  $\mu\text{g kg}^{-1}$  b.w.

### Uvod

Znano je, da je tiroksin pomemben pri urejanju golitve ptičev. Pri kokoši povzroči L-T4 v dozi 500  $\mu\text{g kg}^{-1}$  telesne teže, apliciran vsak dan skozi štiri tedne, golitev deset dni po začetku injiciranja tiroksina (1). Pri puranih je oralna aplikacija tiroksina zadoščala za sprožitev goljenja (2). Ugotovljeno je nadalje, da je T4 značilno učinkovitejši od T3 glede spodbujanja regeneracije peres pri tiroidektomiranih ptičih (3). Ščitnična hormona T3 in T4 kažeta letno (4) in dnevno (5) ritmiko pri ptičih, TRH pa pospeši izločanje tiroksina in trijodotironina (6). Dvig T4 je povezan s spodbujanjem odpuščanja peres in največje vrednosti T3 sovpadajo s pričetkom golitve pri perutnini (7). Spodbujanje golitve s tiroksinom se uporablja pri nekaterih zdravstvenih stanjih in iz drugih razlogov.

O tretiranju papige skobčevke (*Melopsittacus undulatus*) z L-tiroksinom smo že poročali (8); z aplikacijo tiroksina v dozi 1000  $\mu\text{g kg}^{-1}$  telesne teže smo zelo pospešili

sproščanje peres med golitvijo. V tem prispevku obravnavamo meritve T3 in T4 v krvnem serumu, koncentracijo nekaterih elementov v perju in iztrebkih ter višino vrhnjice kože na glavi po tretiranju s tiroksinom (L-T4) in s tiroliberinom (TRH). Z naknadno aplikacijo TRH živalim, ki so pred tem prejemale L-T4, smo želeli raziskati možnost prekinitve hudega eksperimentalnega zavrtja aktivnosti ščitnice, povzročene z visokimi dozami L-T4.

### Material in metode

V glavni poskus smo vključili 64 spolno zrelih enoletnih papig skobčevk (*Melopsittacus undulatus*), od tega smo jih 26 tretirali z natrijevim levotiroksinom (L-T4; Vobenol, LEK Ljubljana) v dozi  $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$  telesne teže vsak dan, z vnosom v golšo s sondo za skobčevke firme Veterinary Speciality Products (Florida, ZDA), 25 dni zapored, 38 živalim kontrolne skupine pa smo aplicirali placebo iz fiziološke raztopine. Poskus se je pričel 10. septembra. TRH (VEB Berlin-Chemie, Nemčija) smo pričeli dajati 5. oktobra in tretiranje je trajalo 10 tednov (trikrat tedensko po  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$  telesne teže i/m v *m. pectoralis*). Vzorce krvi, ščitnic in kože z glave smo vzeli 20. septembra (8 tretiranih in 10 kontrolnih), 5. oktobra (4 tretirane in 4 kontrolne), 24. novembra (4 tretirane z L-T4 ter 4 poprej tretirane z L-T4 in naknadno s TRH; 6 kontrolnih in 6 z naknadnim tretiranjem s TRH) in 15. decembra (3 živali so bile tretirane samo z L-T4 in 3 z naknadno aplikacijo TRH, 6 kontrolnih in 6 z naknadno aplikacijo TRH). V dodatni poskus je bilo vključenih 16 živali; 8 od njih smo tretirali z L-T4  $500 \mu\text{g kg}^{-1}$  telesne teže 16 dni zapored, 8 živali pa je bilo kontrolnih. Redno smo merili temperaturo prostora (vsak dan) in zbirali sproščena peresa zaradi ugotavljanja intenzivnosti golitve. Ob žrtvovanju živali smo peresa populili in jih zbrali za kemično analizo. Iztrebke smo zbirali vsak dan.

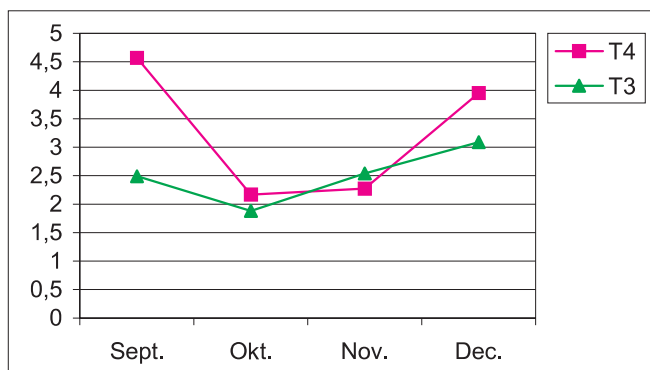
T3 in T4 smo določali v krvnem serumu z radioimunskim postopkom (RIA), pri čemer smo uporabili canine T-3 in canine T-4 firme Diagnostic Corporation (Los Angeles, ZDA). Kemično analizo joda in selena v perju in iztrebkih smo opravili po postopku LICISIR - long irradiation (za selen), cooling (vsaj teden dni), short irradiation (za jod), in radiochemistry, o čemer smo poročali na drugem mestu (9). Elemente Ca, K, Na, P, Zn smo analizirali z atomskim absorpcijskim spektrofotometrom SPECTRAA - 250 PLUS (VARIAN, Victoria, Avstralija). V hidroliziranih vzorcih perja (24 ur v 6,0 M HCl pri  $110^\circ\text{C}$ ) smo ugotavljali vsebnost aminokislin z analizatorjem aminokislin (421 Amino Acid Analyser, Applied Biosystems, Foster city, USA). Material za histološko raziskavo (koščke kože z glave) smo fiksirali v raztopini bouin in jih zalili s parafinom. Tkivne rezine smo obarvali s HE ali s trikromnim barvilom po Goldnerju. Histometrično analizo smo opravili z računalniško podprtim sistemom za analizo slike (program Lucia M firme Optoteam Nikon-Instruments, Dunaj, Avstrija), priključenim na mikroskop Nikon Microphot-FXA.

Živali so bile hranjene s komercialno hrano za papige skobčevke. Z radiokemično nevtronsko aktivacijsko analizo smo v hrani določili vsebnost joda ( $0.813 \pm 0.028$  mg

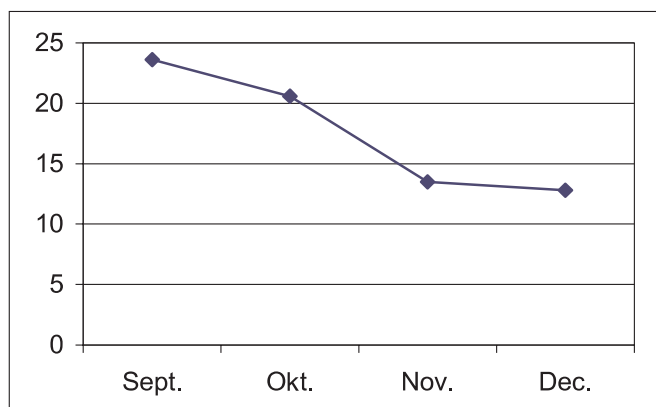
kg<sup>-1</sup>) in selena ( $0.397 \pm 0.037$  mg kg<sup>-1</sup>). Ugotovljene količine so bile v okviru priporočenih vrednosti za perutnino (10).

### Rezultati in razprava

V obdobju september-december vidimo pri koncentraciji ščitničnih hormonov v krvnem serumu kontrolnih papig skobčevk večje vrednosti septembra in decembra (sl. 1). Vrednosti v septembru sovpadajo z intenzivnim goljenjem, v decembru pa s padcem sobne temperature (sl. 2). Pravzaprav je T4 od 20. septembra do 24. novembra padal vzporedno z nižanjem temperature v prostoru z okrog 23 °C na okrog 20 °C, nato pa je sledil obrat in v decembru, pri okrog 13 °C, se je koncentracija T4 in T3 povečala. Razlike v koncentraciji T4 v krvnem serumu v obdobju september / oktober in oktober / december so bile statistično značilne ( $P < 0.05$ ) (tab. 1, skupina K).



Slika 1: Povprečne koncentracije T3 in T4 v krvnem serumu (nmol l<sup>-1</sup>) pri kontrolnih živalih 20. septembra, 5. oktobra, 24. novembra in 15. decembra



Slika 2: Povprečna sobna temperatura (°C) 20. septembra, 5. oktobra, 24. novembra in 15. decembra

Vpliv tiroksina na goljenje papige skobčevke je bil očiten pri živalih, tretiranih z L-T4. Pri živalih, ki smo jih tretirali tik pred pričetkom goljenja z L-T4, se je začelo očitno izpadanje peres okrog 10 dni prej kot pri kontrolnih živalih (8). Tretirane živali so bile ob žrtvovanju nekoliko lažje pri oktobrski skupini, vendar je bila njihova telesna teža vseskozi v okviru fizioloških vrednosti (11).

Pri živalih, tretiranih z L-T4 1000  $\mu\text{g kg}^{-1}$  telesne teže, se je v povprečju zelo povečala koncentracija T3 in T4 v krvnem serumu (tab. 1, skupina L-T4), kar predstavlja okrog 3-kratno oz. približno 30-kratno povečanje glede na koncentracijo T3 in T4 v krvnem serumu kontrolnih živali (tab. 1, skupina K). Njihove ščitnice so imele majhne folikle s sploščenim folikularnim epitelijem. Bile so dejavnostno zavrtle. Vendar so se vrednosti T3 in T4 tretiranih živali v novembru in še posebej v decembru izenačile z vrednostmi kontrolnih živali. Pri živalih, ki so prejele visoke doze tiroksina (1000  $\mu\text{g kg}^{-1}$  telesne teže) se je sprožil mehanizem pospešene eliminacije ščitničnih hormonov. To sklepamo na podlagi dveh pojavov: 1. pri živalih, tretiranih s 500  $\mu\text{g kg}^{-1}$  telesne teže, se je povečala vsebnost T3 in T4 v krvnem serumu v septembru bolj kot pri živalih, tretiranih z dozami 1000  $\mu\text{g kg}^{-1}$  telesne teže, in to statistično značilno za T4 (tab. 2); 2. o eliminaciji ščitničnih hormonov sklepamo po višji vsebnosti joda v perju in povečani vrednosti selena v iztrebkih živali tretiranih s 1000  $\mu\text{g kg}^{-1}$  telesne teže (tab. 2), najbrž kot posledica večjega aktiviranja selenoproteinov (npr. I jodotironin 5-dejodinaze) (12).

Tabela 1: Povprečna koncentracija ( $\text{nmol l}^{-1}$ ;  $\bar{x} \pm \text{SD}$ ) T3 in T4 v krvnem serumu pri skupinah kontrolnih živali (K), pri kontrolnih skupinah naknadno tretiranih s TRH (TRH/K) ter pri z L-T4 tretiranih skupinah (L-T4) in L-T4 skupinah naknadno tretiranih s TRH (TRH/L-T4), glede na čas žrtvovanja živali in glede na število živali (n) v vsaki skupini

Skupina	Hormon	20. sept.	5. okt.	24. nov.	15. dec.
K (n = 26)	T3	2.49 $\pm$ 0.43	2.17 $\pm$ 0.32	2.27 $\pm$ 0.48	3.09 $\pm$ 0.48
	T4	4.57 $\pm$ 1.03 (n = 10)	1.88 $\pm$ 0.59 (n = 4)	2,54 $\pm$ 1.05 (n = 6)	3.95 $\pm$ 0.67 (n = 6)
TRH/K (n = 12)	T3	-	-	2.43 $\pm$ 0.49	3.33 $\pm$ 0.64
	T4	-	-	3,92 $\pm$ 1.63 (n = 6)	5.08 $\pm$ 1.87 (n = 6)
L-T4 (n = 19)	T3	9.32 $\pm$ 1.12	5.75 $\pm$ 1.80	4.52 $\pm$ 1.25	2.57 $\pm$ 0.08
	T4	81.73 $\pm$ 5.01 (n = 8)	80.73 $\pm$ 6.69 (n = 4)	5.39 $\pm$ 1.75 (n = 4)	3.28 $\pm$ 1.75 (n = 3)
TRH/L-T4 (n = 7)	T3	-	-	2.77 $\pm$ 0.43	2.92 $\pm$ 0.08
	T4	-	-	5.80 $\pm$ 1.76 (n = 4)	5.36 $\pm$ 0.31 (n = 3)

Tabela 2: Povprečna vsebnost joda in selena ( $\text{mg kg}^{-1}$  suhe teže) v perju in iztrebkih, vsebnost aminokislina tirozina v perju ( $\text{mg g}^{-1}$ ) ter T3 in T4 v krvnem serumu ( $\text{nmol l}^{-1}$ ) pri kontrolnih (K) in z L-T4 tretiranih živalih (L-T4  $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$  t.t. in L-T4  $500 \mu\text{g kg}^{-1}$  t.t.), merjeno pri materialu, odvzetem 20. septembra

Sestavina	Material	K	L-T4 $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$	L-T4 $500 \mu\text{g kg}^{-1}$
jod	perje	$0.56 \pm 0.03$	$2.33 \pm 0.27$	$0.70 \pm 0.08$
jod	iztrebki	$0.31 \pm 0.01$	$4.53 \pm 0.47$	$8.81 \pm 2.29$
selen	perje	$1.48 \pm 0.27$	$0.53 \pm 0.03$	$0.91 \pm 0.05$
selen	iztrebki	$1.46 \pm 0.22$	$2.79 \pm 0.40$	$1.56 \pm 0.15$
tirozin	perje	24.6	20.1	23.2
T3	krvni serum	$2.49 \pm 0.43$	$9.32 \pm 1.12$	$10.82 \pm 3.47^*$
T4	krvni serum	$4.57 \pm 1.03$	$81.73 \pm 6.59$	$210.45 \pm 57.45^*$

Legenda: \* = merjeno pri štirih živalih; teden dni kasneje pri drugih štirih živalih so bili naslednji rezultati:  $13.46 \pm 2.55 \text{ nmol l}^{-1}$  za T3 in  $263.82 \pm 48.17 \text{ nmol l}^{-1}$  za T4.

V iztrebkih živali, tretiranih s  $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$  telesne teže, je bila ugotovljena 14,5-kratna koncentracija joda v primerjavi s kontrolnimi živalmi oz. 28,5-kratna pri živalih tretiranih s  $500 \mu\text{g kg}^{-1}$  telesne teže. To se v splošnem ujema z razlikami v vsebnosti ščitničnih hormonov v krvnem serumu (13,1-kratna pri živalih, tretiranih z L-T4  $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$  telesne teže, oz. 31,5-kratna pri živalih, tretiranih s  $500 \mu\text{g kg}^{-1}$  telesne teže). Izločanje joda v iztrebkih je torej ustrezalo vsebnosti ščitničnih hormonov v krvnem serumu, kar je skladno s podatki v literaturi (13). Odlaganje joda v perju pa je bilo bistveno večje v skupini živali, tretiranih z L-T4  $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$  telesne teže. To je mogoče razložiti s tem, da se je pri tej skupini pospešilo dejodiranje ščitničnih hormonov in so se presežki joda odlagali v perju.

Tabela 3: Nekateri elementi ( $\text{g kg}^{-1}$ ,  $\text{mg kg}^{-1}$ ) v perju in iztrebkih pri kontrolnih (K) in z L-T4  $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$  b.w. tretiranih (T) živalih ter razmerje med tretiranimi in kontrolnimi živalmi (T : K)

Elementi (simboli)	Perje ( $\text{g kg}^{-1}$ )			Iztrebki ( $\text{g kg}^{-1}$ )		
	K	T	T : K	K	T	T : K
Ca (g)	2.90	4.66	1.60	6.77	12.71	1.87
K (g)	0.21	0.23	1.09	9.15	8.93	0.97
Na (g)	0.22	0.10	0.45	1.54	1.22	0.79
P (g)	3.89	3.08	0.79	29.87	16.83	0.56
Zn (mg)	340.15	108.05	0.31	317.67	158.12	0.49

Analiza kemičnih elementov v perju in iztrebkih (tab. 3) je tudi pokazala bistvene razlike med kontrolnimi in tretiranimi (L-T4  $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$  telesne teže) živalmi. Občutnejša je razlika v vsebnosti kalcija (presežek) ter cinka, natrija in fosforja (primanjkljaj) v perju oz. v iztrebkih, ni pa bilo razlik v vsebnosti kalija. Na podlagi vseh navedenih ugotovitev sklepamo, da je bila doza L-T4  $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$  telesne teže toksična. Vendar pa je bilo odstranjevanje hormonov učinkovito, kajti ravni T3 in T4 v krvnem serumu tretiranih živali so se v novembru in decembru ustalile v okviru vrednosti kontrolnih živali (tab. 1). Glede izmerjenih fizioloških vrednosti T3 in T4



pri kontrolnih živalih velja poudariti, da so bile nižje, kot poroča Roskopf s sod. (14) za papigo skobčevko.

Živali, ki so bile poprej tretirane z L-T4 1000  $\mu\text{g kg}^{-1}$  telesne teže in naknadno s TRH, so imele v novembru nižje vrednosti T3 v krvnem serumu kot tiste, ki so bile tretirane z L-T4, naknadno pa ne s TRH, medtem ko se vrednosti T4 niso bistveno razlikovale. Negotove in statistično neznačilne razlike v koncentraciji T3 in T4 v krvnem serumu pri živalih, tretiranih s TRH, lahko vsaj deloma pojasnimo s podatki iz literature. Po injekciji TRH kokošim (6) se je raven T3 in T4 v krvni plazmi povečala, ko pa je dosegla svoj vrhunec, je raven T4 pospešeno padala, tudi do statistično značilno nižjih vrednosti od tistih pred injiciranjem. Hiter padec T4 lahko razložimo z dejstvom, da je razpolovni čas ščitničnih hormonov pri ptičih kratek, krajši kot pri sesalcih (15).

Učinke aplikacije L-T4 in TRH lahko posredno ovrednotimo tudi z merjenjem višine vrhnjice (tab. 4). Že deset dni po začetku dajanja L-T4 smo opazili razliko v primerjavi s kontrolnimi živalmi. V oktobru, štiri tedne po pričetku dajanja L-T4, pa je bila razlika statistično značilna ( $P < 0,05$ ) in povprečna višina vrhnjice je bila največja ( $8,69 \pm 0,41 \mu\text{m}$ ). V drugi polovici novembra se je znižala do vrednosti, ki so bile podobne tistim pri kontrolnih živalih ( $5,64 \pm 0,4 \mu\text{m}$  proti  $5,43 \pm 0,51 \mu\text{m}$ ). Razlike smo opazili tudi po aplikaciji TRH, še posebej pri kontrolnih živalih. Po aplikaciji TRH je bila povprečna višina vrhnjice večja ( $5,36 \pm 0,79 \mu\text{m}$ ) kot pri kontrolnih živalih, ki niso prejele TRH ( $4,28 \pm 0,35 \mu\text{m}$ ) (tab. 4). Vendar pa je bila vrhnjica pri tistih živalih, ki so prvotno prejele L-T4 in so bile naknadno tretirane s TRH, v novembru značilno debelejša kot pri živalih drugih skupin ( $P < 0,05$ ).

Pri decembrski kontrolni skupini se je raven T3 in T4 dvignila brez spremljajoče zadebelitve vrhnjice. Po oktobru smo opazili težnjo po tanjšanju vrhnjice, ki je bila pri decembrskih živalih najtanjša. To posredno dokazuje, da je povečanje vsebnosti ščitničnih hormonov septembra specifično povezano z regeneracijo vrhnjice in peres. Je pa to tudi skladno s splošnim spoznanjem, da je debelina vrhnjice sorazmerna z gostoto operjenosti. Aplikacija TRH je povzročila določeno proliferacijo vrhnjice, kar dokazujejo meritve višine vrhnjice s področja glave.

Tabela 4: Povprečna višina vrhnjice ( $\mu\text{m}$ ;  $\bar{x} \pm \text{SD}$ ) na glavi pri vseh skupinah živali

Skupina	20. sept.	5. okt.	24. nov.	15. dec.
K	$6,97 \pm 0,17$	$6,64 \pm 0,85$	$5,43 \pm 0,51$	$4,28 \pm 0,35^*$
n = 20	n = 4	n = 4	n = 6	n = 6
TRH/K	-	-	$6,09 \pm 0,39$	$5,36 \pm 0,79$
n = 12	-	-	n = 6	n = 6
L-T4	$7,65 \pm 0,28$	$8,69 \pm 0,41^*$	$5,64 \pm 0,46$	$6,14 \pm 0,23$
n = 14	n = 4	n = 4	n = 3	n = 3
TRH/L-T4	-	-	$7,30 \pm 0,23^*$	$6,10 \pm 0,45$
n = 6	-	-	n = 3	n = 3

\*  $P < 0,05$ ; vertikalno in horizontalno

Pomembno je povzeti, da se po prenehanju tretiranja z L-T4 prično koncentracije T3 in T4 v krvnem serumu hitro zmanjševati, npr. v času od 5. oktobra do 24. novembra, od zelo visokih vrednosti pa do tistih, ki se ne razlikujejo bistveno od vrednosti pri kontrolnih živalih. Tudi višina vrhnjice tretiranih in kontrolnih živali na glavi se v novembru izenači. Ugotovili smo vpliv TRH na raven T3 in T4 v krvnem serumu, kot tudi na debelino vrhnjice. To pomeni, da so ščitnice reagirale na tretiranje s TRH tudi pri tistih živalih, ki so imele poprej z L-T4 zelo zavrto aktivnost žlez.

### Zahvala

Pri analizi materiala je sodelovalo več strokovnjakov z različnih inštitutov. Za pomoč in sodelovanje se iskreno zahvaljujem sodelavcem Inštituta za anatomijo, histologijo in embriologijo, Inštituta za fiziologijo, farmakologijo in toksikologijo in Inštituta za patologijo prehrane pri Veterinarski fakulteti v Ljubljani ter Oddelka za jedrsko kemijo in Oddelka za biokemijo pri Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani. Prof. dr. V. Cestniku se zahvaljujem za strokovne nasvete in pripombe na besedilo, prof. dr. S. V. Bavdku pa za pomoč pri pripravi in izvedbi raziskovalne naloge.

### Literatura

1. Sekimoto K, Imai K, Suzuki M, Takikawa H. Thyroxine induced molting and gonadal functions of laying hens. *Poult Sci* 1987; 66: 752-6.
2. Hines R, Kolattukuty PE, Scharkey P. Pharmacological induction of molt and gonadal involution in birds. In: AAV Main Conference Proceedings. Annual Conference Association of Avian Veterinarians. Nashville, 1993: 127-34.
3. Pant K, Chandola-Saklani A. Effects of thyroxine on avian moulting may not involve prior conversion to tri-iodothyronine. *J Endocrinol* 1993; 137: 265-70.
4. Pathak VK, Chandola A. Seasonal variations in circulating thyroxine and triiodothyronine concentrations in Spotted munia *Lonchura punctulata*. *Gen Comp Endocrin* 1983; 50: 201-4.
5. Newcomer WS. Diurnal rhythms of thyroid function in chicks. *Gen Comp Endocrin* 1974; 24: 65-73.
6. Klandorf H, Sharp PJ, Sterling R. Induction of thyroxine and triiodothyronine release by thyrotrophin-releasing hormone in the hen. *Gen Comp Endocrin* 1978; 34: 377-9.
7. Decuypere E, Verheyen G. Physiological basis of induced moulting and tissue regeneration in fowls. *World Poult Sci J* 1986; 42(1): 56-68.
8. Golob Z, Bavdek SV. Response of the skin to moult induction with thyroxine in the Budgerigar (*Melopsittacus undulatus*). First Scientific Meeting of The European College of Avian Medicine and Surgery in conjunction with The 3<sup>rd</sup> Conference of The European Committee of The Association of Avian Veterinarians. Jerusalem, 1995: 152-7.
9. Golob Z, Stibilj V, Dermelj M, Bavdek SV. Iodine and selenium in Budgerigar (*Melopsittacus undulatus*) juvenile plumage during moulting accelerated by L-thyroxine. Trace elements in man and animals - 9: Proceedings of the Ninth International Symposium on Trace Elements in Man and Animals, PWF Fischer, MR L'Abbé, KA Cockell and RS Gibson (eds.). NRC Research Press, Ottawa, 1997: 602-3.
10. Puls R. Mineral levels in animal health. Diagnostic data. Canada: Sherpa International Clearbook, 1988: 104-5, 194-6.
11. Golob Z, SV Bavdek, V Cestnik. The thyroxine influence on the moulting budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). 5<sup>th</sup> European A.A.V. Conference and 3<sup>rd</sup> ECAMS Scientific Meeting. Main Conference Proceedings and ECAMS Abstracts. Pisa, 1999: 140-3.

12. Behne D, Kyriakopoulos A. Effects of dietary selenium on the tissue concentrations of type I iodothyronine 5-deiodinase and other selenoproteins. *Am J Clin Nutr* 1993; 57:310-2.
13. Ritchie BW, Harrison GJ, Harrison LR. *Avian Medicine: Principles and application*. Florida: Wingers Publishing, 1994: 84-639.
14. Roskopf WJ, Woerpel RW, Roskopf G, Van De Water D. Normal thyroid values for common pet birds. *Vet Med - Small Animal Clin* 1982; 77(3): 409-12.
15. Singh A, Reineke EP, Ringer RK. Thyroxine and triiodothyronine turnover in the chicken and the bobwhite and the Japanese Quail. *Gen Comp Endocrinol* 1967; 9: 353-61.



## **MRI EVALUATION OF ACUTE BRAIN INJURY CAUSED BY KAINATE INTOXICATION**

R. FRANGEŽ, T. PARDUBSKY, K. BERAVS

Key words: epilepsy, kainate, brain, contrast agent, magnetic resonance imaging

The aim of this study was to evaluate the capability of contrast-enhanced magnetic resonance imaging (MRI) for the detection of lesions accompanied by seizures. The lesions were caused by acute insult with systemically administered kainate. T<sub>1</sub>-weighted MR images were taken before and after, both, the insult with kainate and the administration of the contrast medium. Gadomer-17 was the contrast agent used. MR signals obtained from the pre-kainate and post-kainate scans were quantitatively compared to evaluate the contrast enhancement of the brain lesions. Morphological changes were first observed after 40 minutes in both the post-contrast and post-kainate images. Most of the changes in signal intensity were measured in the hippocampus region where the density of kainate receptors in the brain is the highest. The results permit the conclusion that contrast-enhanced MRI is a useful method for determining the location and extent of lesions accompanied by seizures. Therefore, contrast-enhanced MRI can be helpful in diagnosing the location and extent of injuries accompanied by seizures as well as help in the treatment and prognosis of disease.

## **PRIKAZ S KAINATOM POVZROČENIH POŠKODB MOŽGANOV S SLIKANJEM Z MAGNETNO REZONANCO**

Ključne besede: epilepsija, kainat, možgani, kontrastna sredstva, slikanje z magnetno resonanco

Namen raziskave je bil ovrednotiti pomen kontrastnih sredstev za odkrivanje poškodb po epileptičnem napadu pri slikanju z magnetno resonanco. Selektivno poškodbo možganov smo povzročili s sistemsko aplikacijo kainata. S slikanjem z magnetno resonanco smo pridobili T<sub>1</sub> obtežene slike pred sistemsko aplikacijo

---

Delo je prispelo: 29 marca 2001.

Naslovi avtorjev: dr. Robert Frangež, dr. Tine Pardubsky, Veterinarska fakulteta, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana, dr. Katarina Beravs, Inštitut Jožef Štefan, Jamova 39, 1000 Ljubljana.

Citirati: R. Frangež, T. Pardubsky, K. Beravs: MRI evaluation of acute brain injury caused by kainate intoxication. Slov Vet Res 2001; 38 (3): 219-24.

kainata in po njej ter pred apliciranjem kontrastnega sredstva gadomer-17 in po njem. Intenziteto signala na slikah, dobljenega pred injiciranjem kontrasta in po njem, smo kvantitativno ovrednotili in tako ugotavljali spremembe intenzitete signala na področju selektivnih poškodb možganov. Morfološke spremembe so bile vidne 40 minut po injiciranju kainata in kontrasta. Povečano intenziteto signala smo izmerili predvsem na področju hipokampusa, kjer je gostota receptorjev za kainat največja. Iz rezultatov lahko ugotovimo, da je slikanje z magnetno resonanco ob uporabi kontrastnih sredstev primerna metoda za določanje mesta in obsežnosti poškodb, ki se pojavljajo pri epileptičnih napadih, in tako prispeva k prognozi in zdravljenju.

### Introduction

Epilepsy is a chronic condition, characterized by recurrent seizures caused by a 'spontaneous' synchronized and massive excitation of a large number of neurons, leading to generalized or localized activation of motor, sensory, autonomic and complex cognitive and emotional functions. Epilepsy is a common disorder of the brain affecting more than 50 million people worldwide. Epilepsy with life-long recurrent seizures and familial epilepsy are both rare in farm animals although they have been recorded in Brown Swiss cattle (1), Swedish Red cattle and Arabian foal's (2). Epilepsy is most frequently found in different breeds of dogs and within a few genetic animal models with spontaneously occurring seizures (3). There is strong evidence that in some breeds, especially in the Belgian Tervuren, epilepsy is a highly heritable disorder (4).

Various acute and chronic epilepsy models, experimentally produced by different substances, enabled new neurophysiological approaches and a better understanding of the pathophysiology of a seizures origin and development (6, 7). Glutamate is a principal excitatory neurotransmitter in the brain that operates on three families of receptors (AMPA, NMDA and kainate receptors) associated with the  $\text{Ca}^{2+}$  permeable ionic channel (5). Over-activation of glutamate receptors leads to  $\text{Ca}^{2+}$  influx and then to  $\text{Na}^+$  overload. Kainate, which activates the AMPA and kainate receptors, is a cyclic analogue of glutamate and is frequently used as a chronic epilepsy model manifesting itself in chronic recurrent seizures, which closely resembles human temporal lobe epilepsy (6). Kainate induces seizures associated with wide-spread brain damage (3) especially in the inhibitory interneurons of the hippocampus, and in the pyramidal neurons in the  $\text{CA}_1$ ,  $\text{CA}_3$  and  $\text{CA}_4$  areas of the hippocampus, where the highest density of kainate receptors are found (8, 9). Kainate causes swelling of dendrites in hippocampal neurons as their cell bodies are relatively resistant to it (10). Disturbances in  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis seem to be an important cause of epileptogenic activity (11). Kainate, *in vitro*, causes neuronal swelling important for the earliest stages of excitotoxicity accompanied by  $\text{Ca}^{2+}$  influx and  $\text{Na}^+$  overload (12). The neuronal loss is probably caused by sustained AMPA and kainate receptor activation, and increased  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  activity probably produces swelling caused by the activation of a  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$  exchanger and increased  $[\text{Na}^+]_i$  activity. A transiently increased

permeability of the hippocampal blood - brain barrier was noticed in the rats shortly after a single dose treatment with kainate (13).

Pathologies associated with changes in the blood - brain barrier permeability and disturbances in cellular electrolyte homeostasis leading to oedema, are particularly indicated for use of contrast-enhanced MRI. The new contrast agent we used (Gadomer-17) has an intermediate molecular weight (~ 30 kD) with a plasma half-life of approximately 30 minutes. The aim of this study was to establish the capability of contrast-enhanced MRI in detecting and evaluating acute brain tissue damage of an acute epilepsy model produced by kainate administration.

### Materials and methods

Ten male albino Wistar rats weighing between 300 and 350 g were used for the experiment. Kainate, dissolved in a phosphate buffer and adjusted to a pH of 7.4, was administered i.v. (10 mg/kg, Research Biochemicals Inc., Natick, MA, USA) to each animal. A macromolecular contrast agent, Gadomer-17 (~30 kD), was purchased from Schering AG, Berlin, Germany. The animals were anaesthetized with chloral hydrate (300 mg/kg, Merck & Co. NJ, USA). MRI of the brain was performed on a Bruker Biospec system, operating at 2.35 T (Bruker Instruments, Berlin, Germany). The kainate and contrast media were injected systemically using a 24-gauge i.v. cannula with a PTFE catheter (Neoflon<sup>®</sup>, BOC Ohmeda, Helsingborg, Sweden).

The rats were maintained in a room with a controlled light-dark cycle and constant temperature. The animals were first anaesthetized by an i.p. injection of chloral hydrate and then placed in a surface radio frequency coil (length 30 cm, inner diameter 5 cm). A series of control T<sub>1</sub>-weighted spin echo images of the brain (10 images per sequence) were obtained with the following parameter settings: - repetition time (T<sub>R</sub>) = 600 ms, echo time (T<sub>E</sub>) = 18 ms, matrix 256 × 256, section thickness = 1 mm, field of view (FOV) = 7 cm, acquisition time = 10 min. Afterwards, kainate was injected intravenously via a cannulated tail vein. A second series of MR images was obtained before the Gadomer-17 contrast agent was administered. Thirty minutes after the administration of kainate, the Gadomer-17 contrast agent was administered in a dose of 0.025 mmol/kg via the cannulated tail vein. A third series of T<sub>1</sub>-weighted spin echo images was then obtained using the same parameter settings described previously. At the end of the experiments the animals were sacrificed in order to do histological examinations, the results of which are not shown here. Using the Matlab5.3<sup>®</sup> software package, pixel intensity ROI measurements were made in specific brain regions; the amygdaloid and thalamus areas and regions of the hippocampus; to compare the intensity of MR-signal changes at various time points after the kainate intoxication. The ROI was in the order of a few pixels. This was done to compare the intensity of MR-signal changes in these neuroanatomic regions before and after kainate intoxication. The calculated signal intensity was corrected for signal variations against a water phantom. Signal intensity ratios (SIR) were calculated as a subtraction of post-contrast ROI and pre-contrast



ROI of the defined region. Mean values of signal intensity change were compared by means of a student t-test to assign the statistical significance at 5 %.

### Results

No morphological abnormalities were observed through the selected brain tissue (2-5 mm caudal to Bregma) in the pre-contrast control images (not shown) or the pre-contrast post-kainate images (Fig. 1-A). The areas filled with fluids appeared hypointense and differentiation of injured tissue was not possible.

One hour post-kainate and immediately after the contrast agent administration, marked morphological changes (a, b, c and d) showing as hyperintensity were observed, first of all, in the CA1 and CA3 regions of the pyramidal neurons of the hippocampus (Fig. 1-B). The hyperintensity was due to the contrast agent which shortened the  $T_1$  of fluids i.e. oedema around the injured tissue. No enhancement was observed on the later sets of MR images (obtained 40 minutes after the Gadomer-17

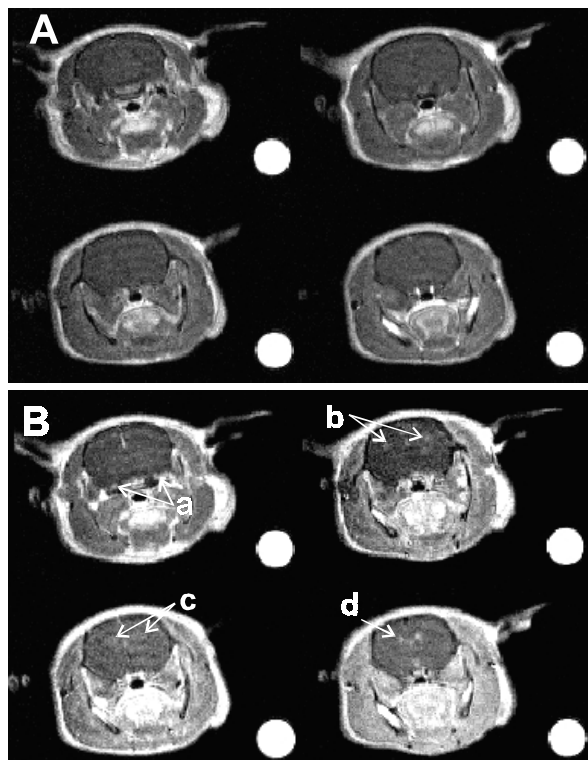


Figure 1: Kainate epilepsy model. (A-B) The clusters of four MR images are arranged as follows: (A) pre-contrast-control MR images (B) 1 hour post-kainate (immediately post-contrast). The arrows are pointing to the (a) amygdala and piriform cortex, (b) thalamus, (c) hippocampus and (d) lateral ventricles. Scan levels 1, 2, 3 and 4 are from the area of the tympanic bulla up to the rostral skull groove

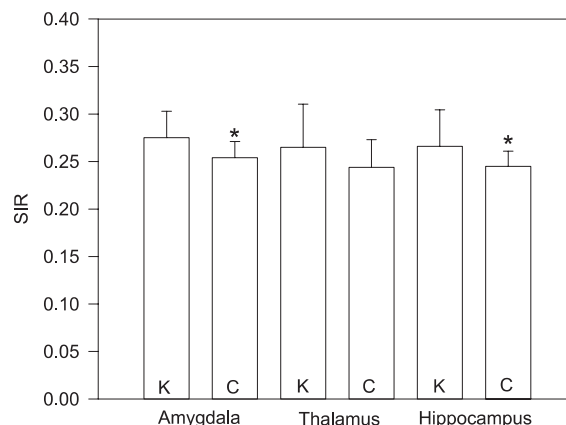


Figure 2: Changes in the MRI signal intensity (SIR). Comparison of MR signals obtained from the amygdala, thalamus and hippocampus (n=10) before (C) and after kainate (K) injury. The results are expressed as mean value  $\pm$  SD. \* =  $p < 0.05$  (Student t-test). A significant increase in the MR signal was measured in the amygdala and hippocampus after the kainate injury

administration). This was due to elimination of Gadomer-17 and its clearance through the kidneys.

Quantitative analysis of the MR images showed a significant increase in MR signal intensity measured in the region of hippocampus and amygdala (Fig. 2), where morphological changes were also observed (Fig. 1) and brain tissue injury was later confirmed by histological examination (data not shown).

### Discussion

Seizures are accompanied by an over-stimulation of glutamate receptors and excessive activation of associated channels, leading to disturbances in the electrolyte homeostasis of inhibitory neurons and to intracellular oedema development. Several other factors can also contribute to seizure development, for example: hypomagnesaemia, activation of AMPA receptors associated with  $\text{Na}^+$  permeable channels, hyperkalemia, hypoglycaemia and  $\text{O}_2$  deficiency. Our experimental data indicates that the macromolecular contrast agent, Gadomer-17, can be effectively used to identify kainate lesions that accompany seizures. This is shown in both figure 1B and figure 2.

Surgical resection of the hippocampus and associated limbic structures (amygdala) is frequently used as last possible mode of treatment if antiepileptic drugs fail. This is especially so for chronic focal intractable epilepsy (14). Our data showed, that a contrast-enhanced MRI can provide useful information about the location and extent of epileptogenic zones in epileptic patients, and enable an evaluation of an injury, an important step in the successful surgical treatment and prognosis of the disease.

Increased MR signals in some regions of the hippocampus indicated both an increased blood - brain barrier permeability and an oedema development that accompanies the onset of seizures and is consistent with reports from other authors (13). Therefore contrast enhanced MRI enables early localization and evaluation of brain lesions caused by direct kainate action and brain lesions accompanying the onset of seizures.

#### References

1. Radostitis JD, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. *Veterinary medicine*. London: Saunders, 1999: 541-2.
2. Aiello SE. *The Merck veterinary manual*, Rahway: Merck, 1998: 899-901.
3. Löcher W. Animal models of intractable epilepsy. *Prog Neurobiol* 1997; 53(2): 239-58.
4. Famula TR, Oberbauer AM. Reducing the incidence of epileptic seizures in the Belgian Tervuren through selection. *Prev Vet Med* 1998; 33(1-4): 251-9.
5. Meldrum BS, Akbar MT, Chapman AG. Glutamate receptors and transporters in genetic and acquired models of epilepsy. *Epilepsy Res* 1999; 36(2-3): 189-204.
6. Stevens KE, Nagamoto H, Johnson RG, Adams CE, Rose GM. Kainic acid lesions in adult rats as a model of schizophrenia: changes in auditory information processing. *Neuroscience* 1998; 82(3): 701-8.
7. Araki T, Tanaka T, Tanaka S, Yonemasu Y, Kato M, Goto I. Kainic acid-induced thalamic seizure in cats-a possible model of petit mal seizure. *Epilepsy Res* 1992; 13: 223-29.
8. Beal MF, Ferrante RJ, Swartz KJ, Kowall NW. Chronic quinolinic acid lesions in rats closely resemble Huntington's disease. *J Neurosci* 1991; 11: 1649-59.
9. Dingledine R, McBain CJ, McNamara JO. Excitatory amino acid receptors in epilepsy. *Trends Pharmacol Sci* 1990; 11: 334-8.
10. Al-Noori S, Swann JW. A role for sodium and chloride in kainic acid-induced beading of inhibitory interneuron dendrites. *Neuroscience* 2000; 101(2): 337-48.
11. Ong WY, Ren MQ, Makjanic J, Lim TM, Watt F. A nuclear microscopic study of elemental changes in the rat hippocampus after kainate-induced neuronal injury. *J Neurochem* 1999; 72(4): 1574-9.
12. Bindokaz VP, Miller RJ. Excitotoxic degeneration is initiated at non-random sites in cultured rat cerebellar neurons. *J Neurosci* 1995; 15(11): 6999-7011.
13. Pont F, Collet A, Lallement G. Early and transient increase of rat hippocampal blood-brain barrier permeability to amino acids during kainic acid-induced seizures. *Neurosci Lett* 1995; 184 (1): 52-4.
14. Spencer SS, Spencer DD. Entorhinal-hippocampal interactions in medial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 1994; 35(4): 721-7.

## **UGOTAVLJANJE ZAOSTANKOV DAPSONA V MIŠIČNEM TKIVU IN URINU KLAVNIH ŽIVALI**

N. KOŽUH ERŽEN

**Ključne besede:** higiena živil; nadzor nad živali; veterinarska medicina; zaostanki zdravil; dapson; klavne živali

Nadzor nad živali živalskega izvora ima posebno vlogo tako v veterinarski medicini kot tudi v prehranski industriji. Še posebej pomemben je nadzor nad zaostanki tistih zdravil, ki so v veterinarski medicini prepovedana za uporabo pri živalih, namenjenih za prehrano ljudi. Med te veterinarsko medicinske preparate uvrščamo tudi zdravila, ki vsebujejo aktivno učinkovino dapson.

Za ugotavljanje zaostankov dapsona v mišičnem tkivu in urinu klavnih živali smo uvedli in modificirali analitsko metodo, ki je vključevala v prvi fazi ekstrakcijo zaostankov dapsona iz vzorcev in nato kakovostno in količinsko ugotavljanje njihovih zaostankov s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) z UV zaznavanjem. Metoda ima sorazmerno dober izkoristek in ponovljivost, nizko mejo zaznavnosti ter zadovoljivo selektivnost.

## **DETERMINATION OF DAPSONE RESIDUES IN MUSCLE TISSUE AND URINE OF FOOD-PRODUCING ANIMALS**

**Key words:** food hygiene; food inspection; veterinary medicine; drug residues; dapson; food-producing animals

Food inspection, especially the inspection of drug residues, is of great importance in both veterinary medicine and the food industry. The use of some pharmacological agents is prohibited in food-producing animals. Dapsone is one of these agents.

A high performance liquid chromatography, with ultraviolet detection and an appropriate sample clean-up, has been modified and employed for the qualitative and quantitative determination of dapson residues in muscle tissue and urine of

---

Delo je prispelo 22. maja 2001.

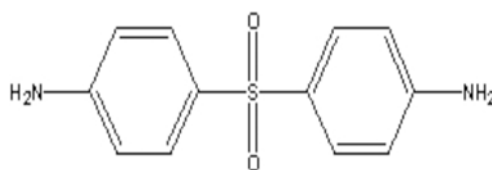
Naslov avtorice: znan. sod. dr. Nevenka Kožuh Eržen, univ. dipl. kem., Inštitut za fiziologijo, farmakologijo in toksikologijo, Veterinarska fakulteta, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana.

Citirati: Kožuh Eržen N. Determination of dapson residues in muscle tissue and urine of food-producing animals. Slov Vet Res 2001; 38 (3): 225-33.

food-producing animals. This analytical method enables relatively good recovery, selectivity and reproducibility of the measurements as well as a low detection limit.

### Uvod

Dapson je antibiotik, ki ga kemijsko uvrščamo v skupino sulfonamidov (1). Njegova struktura je predstavljena na sliki 1.



Slika 1: Strukturna formula dapsona

Dapson se je v veterinarski medicini s parenteralnim dajanjem uporabljal predvsem za zdravljenje kužnih in zajedavskih bolezni (koccidoze, intrauterino zdravljenje vnetja maternične stene, intramamarno zdravljenje mastitisa). Zanj je značilno, da deluje izredno antimikrobno (MIC 0,5 - 128 µg/ml) (2). V humani medicini se še vedno uporablja kot zdravilo proti gobavosti, malariji, toksoplazmozi, aktinomikozi, tuberkulozi in dermatitisu podobnemu herpesu (1, 3). Znani so njegovi stranski učinki, kot so hemolitična anemija, zmanjšanje števila belih krvnih teles, atrofija organov, degeneracija jeter ter želodčno-črevesni in nevrološki učinki. Za dapson je značilno, da se v organizmu razporedi med telesne tekočine in tkiva. Kopiči se v mišicah, jetrih in ledvicah, iz organizma pa se izloča z urinom.

V Sloveniji je uporaba zdravil, ki kot aktivno učinkovino vsebujejo dapson, v veterinarski medicini za rejne živali uradno prepovedana od leta 1999 (Ur. list RS, št. 88/99) (4). V Evropski uniji prepoved uporabe omenjenih zdravil pri živalih, namenjenih za prehrano ljudi, velja že od leta 1993 z regulativo 3426/93 (5). Pred prepovedjo je bila v državah EU določena največja dopustna koncentracija (MRL) zaostankov dapsona v živilih živalskega izvora (tkiva, mleko) 25 ng/g. S prepovedjo njene uporabe se substanca sedaj uvršča med farmacevtske učinkovine iz Aneksa IV Evropske unije, regulative 2377/90 (6), za katere ni mogoče določiti za človeka še varne količine zaostankov v živilih in je zato njegova toleranca enaka 0. V kontrolnih laboratorijih je prav zaradi tega razloga nujno uporabljati čim bolj selektivne in občutljive analitske metode.

V literaturi smo zasledili izredno malo analitskih metod, uporabnih za ugotavljanje zaostankov dapsona v mišičnem tkivu in urinu klavnih živali (7-13). Posebno problematičen in zahteven je postopek čiščenja vzorcev, ki je potreben pred kakovostnim in količinskim ugotavljanjem substance z različnimi kromatografskimi tehnikami.

Namen našega dela je bil uvesti analitski postopek za kakovostno in količinsko ugotavljanje zaostankov dapsona v mišičnem tkivu in urinu klavnih živali. Metoda

vključuje tehniko tekočinske kromatografije visoke ločljivosti z UV zaznavanjem in ustrezno predhodno pripravo oziroma čiščenje vzorcev. Predstavljeno analitsko metodo smo uspešno uporabili za veterinarsko sanitarni nadzor nad živili živalskega izvora (monitoring) v Sloveniji.

## Material in metode

### *Vzorci*

Mišično tkivo: Vzorce mišičnega tkiva smo po prispetju v laboratorij homogenizirali s homogenizatorjem ("multipraktik") in jih nato do analize shranili v zamrzovalniku na temperaturi  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  v plastičnih lončkih, zaščitene pred svetlobo.

Urin: Vzorce urina, ki so bili odvzeti v posebne polipropilenske lončke in zaščiteni pred svetlobo, smo pred analizo prefiltrirali skozi filtrirni papir "modri trak" in jih nato do analize shranili v zamrzovalniku na temperaturi  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  v polipropilenskih epruvetah.

Standardne raztopine: Za pripravo standardnih raztopin dapsona smo uporabili standardno substanco dapsona 98 % čistosti proizvajalca Aldricha, ki smo jo hranili v hladilniku pri  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  ustrezno zaščiteni pred svetlobo. Osnovno standardno raztopino dapsona v koncentraciji  $0,5\text{ mg/ml}$  in vmesno redčitev  $10\text{ }\mu\text{g/ml}$  smo pripravili v metanolu v temnih, steklenih, poprej silaniziranih bučkah. Delovne raztopine standardov dapsona v koncentraciji od  $1000$  do  $5,0\text{ ng/ml}$  pa smo pripravili v mobilni fazi, prav tako v temnih, steklenih, poprej silaniziranih bučkah. Delovne raztopine so bile obstojne en teden.

### *Reagenti*

Kakovost vseh reagentov, ki smo jih uporabili, je bila primerna za kromatografijo. Uporabili smo metanol, acetonitril in etilacetat proizvajalca Mercka (kakovost LiChrosolv), od istega proizvajalca je bila tudi klorovodikova kislina. Za pripravo mobilne faze smo uporabili tudi amonijev acetat proizvajalca Riedel de Haën. Steklovino smo silanizirali s Supelcovim reagentom sylon CT.

### *Aparature*

Pri analizah smo za ekstrakcijo vzorcev uporabili stresalnik proizvajalca Tehtnica Železniki (VIBROMIX 313 EVT), električni stresalnik za intenzivno mešanje ("vortex") istega proizvajalca (VIBROMIX 204 EV) in Iskrino ultrazvočno kopel (UZ 2R). Za centrifugiranje vzorcev smo uporabljali centrifugo proizvajalca Hetticha (ROTIXA/RP). Ekstrakte smo izparevali pod dušikom ob uporabi evaporatorja N-EVAP No.111 proizvajalca Organomationa. Za uravnavanje pH vrednosti mobilne faze smo uporabili pH meter (MI 229) proizvajalca Mettler Toledo, za filtracijo mobilne faze pa pribor za filtriranje proizvajalca Supelca. Za ugotavljanje zaostankov dapsona smo uporabili tekočinski kromatograf visoke ločljivosti proizvajalca Thermo Separation Products s črpalko Spectra Systems P2000 s samovzorčevalnikom AS300 ter z UV detektorjem Spectra Systems UV2000. Za kromatografsko ločbo smo

uporabili analitsko kolono proizvajalca Perkin Elmer Pecospher 3 C-18 (83 x 4,6 mm ID; 3  $\mu$ m delci) s predkolono Perkin Elmer Aquapore ODS RP-18 (15 x 3,2 mm ID; 7  $\mu$ m delci) istega proizvajalca.

#### *Analitski postopek*

Ekstrakcija zaostankov dapsona iz vzorcev. Za ekstrakcijo zaostankov dapsona iz vzorcev mišičnega tkiva in urina smo uporabili etilacetat.

Mišično tkivo: V 50 ml teflonsko centrifugirko smo natehtali 5,0 g mišičnega tkiva, ga nakisali z dodatkom 200  $\mu$ l 1 M HCl in ga ekstrahirali s 25,0 ml etilacetata ob 30-minutnem stresanju na stresalniku pri sobni temperaturi (zaščiteno pred svetlobo) in 350 obr./min in nato ga še 30 minut izpostavili ultrazvoku. Vzorce smo po ekstrakciji centrifugirali 10 minut pri 20 °C pri 3000 obr./min. 20,0 ml organske faze smo nato izparili pod N<sub>2</sub> pri 40 °C do suhega in ostanek raztopili v 2,0 ml mobilne faze. Vzorce smo prenesli v stekleničke za samovzorčevanje in za analizo na sistemu HPLC injicirali 150  $\mu$ l ekstrakta.

Urin: 0,8 ml urina smo ekstrahirali z 2,0 ml etilacetata ob 30-minutnem stresanju na stresalniku pri sobni temperaturi in 350 obr./min in jih nato centrifugirali 10 minut pri 20 °C in 3000 obr./min. Organsko fazo smo ločili in postopek ekstrakcije ponovili. Organski fazi smo nato združili (2 x 2,0 ml) in vzorce izparili pod N<sub>2</sub> pri 40 °C do suhega. Suhi ostanek smo nato raztopili v 0,5 ml mobilne faze. Vzorce smo prenesli v stekleničke za samovzorčevanje in v sistem HPLC injicirali 150  $\mu$ l ekstrakta.

Meritve HPLC. Pri meritvah HPLC smo kot mobilno fazo uporabili mešanico 0,015 M amonijevega acetata pH vrednosti 6,6 in acetonitrila v volumskem razmerju 79 : 21. Za kromatografsko separacijo smo uporabili kolono Perkin Elmer Pecospher 3 C-18 (83 x 4,6 mm ID; 3  $\mu$ m delci) s predkolono Perkin Elmer Aquapore ODS RP-18 (15 x 3,2 mm ID; 7  $\mu$ m delci). Pretok mobilne faze je bil 2 ml/min pri temperaturi kolone 40 °C in valovni dolžini 293 nm.

Ustreznost kromatografskega sistema (SST) smo testirali pred vsakim setom meritev z upoštevanjem naslednjih parametrov:

število teoretičnih podov (N): najmanj 1000

kapacitivni faktor ( $k'$ ): najmanj 1,0

asimetričnost kromatografskega vrha na 10% (T): največ 2,0

RSD % zadrževalnega časa: največ 2,5%

### **Rezultati in razprava**

Ker je uporaba veterinarskih zdravil, ki kot aktivno učinkovino vsebujejo dapson, v Sloveniji prepovedana (4), je zaradi morebitne nelegalne uporabe teh zdravil nadzor nad živili živalskega izvora izredno pomemben. V ta namen je bilo potrebno uporabiti analitsko metodo, ki je bila dovolj selektivna in občutljiva za ugotavljanje omenjene substance, tako v živilih živalskega izvora kot tudi v urinu. Uvedli smo analitsko metodo, ki smo jo ustrezno modificirali glede na objavljene analitske

metode za ugotavljanje zaostankov dapsona v živilih živalskega izvora avtorjev Roudauta in Moretaina (7), Roudauta in Garnierja (8) ter Aerts s sodelavci (11). Za ekstrakcijo zaostankov dapsona smo uporabili etilacetat, pri kromatografiji smo modificirali mobilno fazo, uporabili različno separacijsko (analitsko) kolono in enostavnejši način zaznavanja.

Pri kakovostnem in količinskem ugotavljanju zaostankov dapsona v vzorcih mišičnega tkiva in urina je priprava vzorcev, predvsem čiščenje ekstraktov, pred ugotavljanjem vsebnosti s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) najpomembnejša stopnja analize. Vzorce je namreč potrebno vedno pripraviti tako, da ima matriks vzorca (ozadje) pri zaznavanju čim manjši vpliv. S tem je dosežena čim boljša selektivnost ugotavljanja. V ta namen je potrebno ekstrakte vzorcev ustrezno očistiti, običajno z različnimi tehnikami ekstrakcije tekoče-tekoče, trdno-tekoče oziroma z uporabo ustreznih separacijskih kolonic. Tako kot za vsako analitsko metodo je tudi za analitske metode ugotavljanja zaostankov veterinarskih zdravil, posebno še prepovedanih substanc, izredno pomembno, da jih ustrezno ovrednotimo (validiramo).

Na začetku uvajanja opisane metode smo izbrali najprimernejše kromatografske pogoje. Z merjenjem absorpcije standardne raztopine dapsona v koncentraciji 100 ng/ml v območju valovnih dolžin med 210 in 400 nm smo določili njen maksimum pri 293 nm. Pri tej valovni dolžini smo nato na sistemu HPLC s standardno raztopino dapsona v koncentraciji 100 ng/ml testirali različne vrste kromatografskih kolon (Nova-Pak C<sub>18</sub>, µBondapak C<sub>18</sub>, LiChrospher 60 RP Select-B, Hypersil ODS itd.) in za meritve izbrali tisto, ki je omogočala največjo občutljivost in ponovljivost merjenja petih zaporednih injiciranj, pri kromatografskih pogojih, opisanih v poglavju Materiali in metode. Med vsemi kolonami, ki smo jih testirali, je kolona Perkin Elmer Pecospher 3 C-18 (83 x 4,6 mm ID; 3 µm delci) s predkolono Perkin Elmer Aquapore ODS RP-18 (15 x 3,2 mm ID; 7 µm delci) omogočala največjo občutljivost določanja in najboljšo ponovljivost petih zaporednih injiciranj 150 µl standardne raztopine (RSD < 1%).

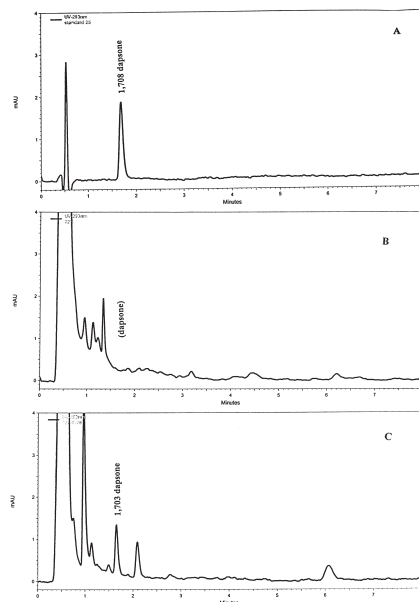
S standardnimi raztopinami v koncentracijah dapsona pod 100 ng/ml, ki smo jih pripravili v mobilni fazi, smo pri optimalnih pogojih merjenja najprej določili najnižjo koncentracijo dapsona, ki smo jo še lahko zanesljivo ugotovili. Ugotovili smo mejo zaznavnosti dapsona (LOD) 2,5 ng/ml. Linearnost merjenja standardov, pripravljenih v mobilni fazi s korelacijskim koeficientom, večjim od 0,998, je bila v območju od 2,5 do 1000 ng/ml.

Na slikah 2 in 3 so prikazani kromatogrami, značilni za standardno raztopino dapsona v mobilni fazi v koncentraciji 25 ng/ml, slepega vzorca mišičnega tkiva in vzorca mišičnega tkiva, obogatenega z dapsonom v koncentraciji 25 ng/g, ter kromatogram, značilen za slepi vzorec urina, in vzorec urina, ravno tako obogatenega z dapsonom v koncentraciji 25 ng/ml.

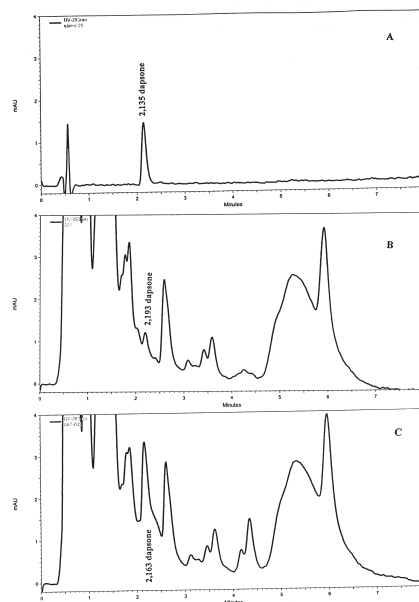
Iz kromatogramov, prikazanih na slikah 2 in 3, je razvidna relativno dobra selektivnost, tako za vzorce mišičnega tkiva kot tudi za vzorce urina.

Pri ugotavljanju zaostankov dapsona v vzorcih mišičnega tkiva in urina je bilo potrebno vzorce najprej ekstrahirati z ustrezno količino etilacetata, kar smo pri vzorcih urina še enkrat ponovili. Pri ugotavljanju zaostankov dapsona tako pri vzorcih mišičnega tkiva kot tudi pri vzorcih urina dodatno čiščenje etilacetatnih





Slika 2: Značilni kromatogrami standardne raztopine dapsona v mobilni fazi v koncentraciji 25 ng/ml (A), slepega vzorca mišičnega tkiva (B) in vzorca mišičnega tkiva, obogatenega z dapsonom v koncentraciji 25 ng/g (C)



Slika 3: Značilni kromatogrami standardne raztopine dapsona v mobilni fazi v koncentraciji 25 ng/ml (A), slepega vzorca urina (B) in vzorca urina, obogatenega z dapsonom v koncentraciji 25 ng/ml (C)

ekstraktov ni bilo potrebno, ker smo pri zaznavanju dosegli dovolj dobro selektivnost. Zaradi svetlobne občutljivosti dapsona smo vzorce med analizo ustrezno zaščitili pred svetlobo.

Poleg selektivnosti je bilo pri analitski metodi potrebno preveriti tudi izkoristek. Preverjali smo ga z dvema različnima koncentracijama dapsona, ki smo ga dodali slepemu vzorcu urina in mišičnega tkiva. Slepim vzorcem mišičnega tkiva smo dapson dodali v koncentraciji 10 in 25 ng/g, slepim vzorcem urina pa zaradi bolj kompleksnega matriksa vzorca poleg 10 in 25 ng/ml še v koncentraciji 50 ng/ml.

V tabeli 1 so prikazani izkoristki metode in njena ponovljivost pri ugotavljanju ostankov dapsona v mišičnem tkivu (dodatek 10 in 25 ng/g).

Tabela 1: Izkoristek metode in njena ponovljivost pri ugotavljanju zaostankov dapsona v mišičnem tkivu (dodatek 10 in 25 ng/g)

Ozadje slepega vzorca (ng/g)	Standardni dodatek 10 ng/g (50 ng)		Standardni dodatek 25 ng/g (125 ng)	
	ugotovljena vsebnost (ng)	izkoristek (%)	ugotovljena vsebnost (ng)	izkoristek (%)
1,97	36,98	74,0	80,93	64,7
1,29	25,40	50,8	74,22	59,4
1,88	28,20	56,4	84,82	67,9
< 1,25	32,30	64,6	103,8	83,0
< 1,25	26,68	53,4	90,52	72,4
<1,25	27,4	54,8	90,12	72,1
Povprečje (%)		59,0		69,9
RSD (%)		14,7		11,5

Iz tabele 1 je razvidno, da je bil povprečni izkoristek metode pri dodatku dapsona v koncentraciji 10 ppb 59,0 %, v koncentraciji 25 ppb pa 69,9 %. Povprečni izkoristek je bil za mišično tkivo razmeroma nizek, in sicer le krog 64 %.

V tabeli 2 so prikazani izkoristki metode in njegova ponovljivost pri ugotavljanju zaostankov dapsona v urinu (dodatek 10, 25 in 50 ng/ml).

Tabela 2: Izkoristek metode in njegova ponovljivost pri ugotavljanju zaostankov dapsona v urinu (dodatek 10, 25 in 50 ng/ml)

Ozadje slepega vzorca (ng/ml)	Standardni dodatek 10 ng/ml		Standardni dodatek 25 ng/ml		Standardni dodatek 50 ng/ml	
	ugotovljena vsebnost (ng/ml)	izkoristek (%)	ugotovljena vsebnost (ng/ml)	izkoristek (%)	ugotovljena vsebnost (ng/ml)	izkoristek (%)
< 2,50	4,48	44,8	17,79	71,2	28,57	57,1
< 2,50	6,41	64,1	19,34	77,3	28,58	57,2
< 2,50	4,43	44,4	18,43	73,7	35,5	71,0
2,88	/	/	22,0	88,0	/	/
< 2,50	/	/	20,01	80,0	/	/
Povprečje (%)		51,1		78,0		61,8
RSD (%)		22,1		8,35		12,9

/ ... meritev ni bila izvedena

Iz tabele 2 je razvidno, da je bil povprečni izkoristek metode pri urinu ravno tako kot pri mišičnem tkivu le okrog 64 %.

Za zmanjšanje naključne napake pri ugotavljanju zaostankov dapsona smo pri vsakodnevnem setu meritev 6 vzorcev izkoristek preverjali vedno z dvema paralelnima vzorcema, obogatena z dapsonom v koncentraciji 10 in 25 ppb.

Določili smo tudi mejo zaznavnosti (LOD) in mejo vrednotenja zaostankov dapsona (LOQ), to je kvantitativno vsebnost dapsona, ki jo v posameznem matriksu še lahko določimo z ustrezno ponovljivostjo in z določeno mejo zanesljivosti. Mejo zaznavnosti smo določili tako, da smo povprečni ugotovljeni vrednosti za dvajset slepih vzorcev urina ali mišičnega tkiva prišteli še trikratno vrednost standardnega odmika (14). Za urin je bila povprečna vrednost dvajsetih slepih vzorcev 2,54 ng/ml in standardni odmik 0,50 ng/ml, kar je pomenilo mejo zaznavnosti za dapson v urinu 4,0 ng/ml. Povprečna vrednost dvajsetih slepih vzorcev mišičnega tkiva pa je bila 1,48 ng/g in njen standardni odmik 0,35 ng/g. Meja zaznavnosti zaostankov dapsona v mišičnem tkivu je bila v primerjavi z urinom, nižja in sicer 2,5 ng/g. Meja vrednotenja zaostankov dapsona (LOQ) tako v urinu kot v mišičnem tkivu je bila 10 ppb.

Glede na veljavno evropsko zakonodajo pred letom 1993, ki je dopuščala največjo koncentracijo zaostankov dapsona v tkivih in mleku 25 ppb in določeno LOD naše metode, t.j. 2,54 ppb za mišično tkivo in 4,0 ng/ml za urin ter LOQ 10 ppb, smo razvito analitsko metodo lahko uporabili za ugotavljanje zaostankov dapsona v živilih živalskega izvora in v urinu.

V primeru pozitivnega rezultata bi bilo potrebno analizo ponoviti v s tremi paralelnimi določitvami istega vzorca in s po dvema paralelnima določitvama istega vzorca, obogatena z dapsonom v koncentraciji 10 in 25 ppb. Na tak način bi lahko utemeljili, da je vzorec sumljiv. Glede na evropsko zakonodajo (Council Directive 96/23/EC) (14) pa je sumljive vzorce potrebno potrditi še s tekočinsko kromatografijo z masno selektivnim zaznavanjem (LC-MSD). Le tako bi lahko sumljive vzorce zanesljivo potrdili kot pozitivne.

#### Literatura

1. Katzung BG. Basic and clinical pharmacology. Stamford: Appleton & Lange, 1998; 777-8.
2. Report of Commite for veterinary medicinal products. London: The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Veterinary Medicines Evaluation Units, 2000.
3. Lüllmann H, Mohr K, Ziegler, Bieger D. Color atlas of pharmacology. Stuttgart: Thieme Verlag, 2000: 280-1.
4. Uradni list Republike Slovenije 1999; 88: 13377.
5. Commission Regulation (EC) No 3426/93 amending Annexes III and IV to Council Regulation (EEC) No 2377/90 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. Off J Eur Commun 1993; L213: 15-7.
6. Council Regulation (EEC) No 2377/90 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. Off J Eur Commun 1990; L224: 1-8.
7. Roudaut B, Moretain JP. Sulphonamide residues in milk of dairy cows following intravenous injection. Food Addit Contam 1990; 7 (4): 527-33.
8. Roudaut B, Garnier M. Sulphonamide and dapsone residues in bovine milk following intramammary infusion. Food Addit Contam 1993; 10 (4): 461-8.

9. Zuidema T, Beek WMJ, Keukens HJ. Towards a generic extraction method for the analysis of veterinary drugs in egg. Proceedings of the EuroResidue IV In: the Conference on residues of Veterinary Drugs in Food. Veldhoven, Federation of European Chemical Societies, Working Party on Food Chemistry, 2000: 1158-63.
10. Abuirjeie MA, Irshaid YM, Al-Hadidi HF, Rawashdeh NM. Simultaneous high performance liquid chromatographic determination of dapsone and monoacetyldapsone in human plasma and urine. *J Clin Pharm Ther* 1991; 16: 247-55.
11. Aerts MML, Beek WMJ, Brinkman UATH. Monitoring of veterinary drug residues by a combination of continuous flow techniques and column-switching high-performance liquid chromatography I. Sulphonamides in egg, meat and milk using post-column derivatization with dimethylaminobenzaldehyde. *J Chromatogr* 1988; 435: 97-112.
12. Queiroz RHC, Dreossi SAC, Carvalho D. A rapid, specific, and sensitive method for the determination of acetylation phenotype using dapsone. *J Anal Toxicol* 1997; 21: 203-7.
13. Tingle MD, Mahmud R, Maggs JL, Pirmohamed M, Park BK. Comparison of the metabolism and toxicity of dapsone in rat, mouse and man. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 283: 817-23.
14. European Commission Directorate General for Agriculture. Commission decision laying down analytical methods to be used for detecting certain substances and residues thereof in live animals and animal products according to Council Directive 96/23/EC. 1999; Final version.



## **PREGLED POGOSTNOSTI SEROVAROV SALMONEL V DESETLETNEM OBDOBJU 1979 - 1988**

R. ŠČUKA, P. LAZAR, L. ŠČUKA

Ključne besede: *Salmonella*; perutnina; krmila; človek; retrospektiva

V letih od 1979 do 1988 smo pri ljudeh izolirali 31067 sevov salmonel, ki smo jih uvrstili v 122 različnih serovarov. Pri perutnini je bilo v enakem obdobju ugotovljenih 936 sevov salmonel, ki so pripadali 44 serovarom, v krmilih pa 539 sevov salmonel, ki so bili uvrščeni v 67 različnih serovarov.

Upoštevali smo deset najpogostejših serovarov, posebej pri človeku, perutnini in v krmi. Pogostnost in povezave smo ocenili na osnovi razlik med rangi, s Friedmanovim testom in na osnovi Spearmanove korelacije rangov.

Glavna pot okužbe poteka kot bilateralen prenos med človekom in perutnino in ne od krme preko perutnine na človeka.

Izkušnje, ki smo jih pridobili v zadnjih nekaj letih, so nam pokazale, da je nujno povečati natančen in neprekinjen nadzor v reji živali, ob zakolu in pri obdelavi mesa.

## **RETROSPECTIVE SURVEY OF THE INCIDENCE OF SALMONELLA SEROVAR OVER A 10-YEAR PERIOD 1979 - 1988**

Key words: *Salmonella*; poultry; feedstuffs; human; retrospective

Between 1979 and 1988 31,067 prime isolates of unadapted salmonellae in humans were determined and classified into 122 different serovars. In poultry, 936 strains belonging to 44 serovars were identified, and in feedstuffs 539 strains were classified into 67 different serovars.

The ten most prevalent serovars isolated from each group i.e. humans, poultry and feedstuffs, were taken into account. Their frequencies and associations were evaluated by rank analyses, the Friedman test and Spearman's rank correlation test.

---

Delo je prispelo 28. maja 2001.

Naslov avtorjev: dr. Rogerij Ščuka, dr. vet. med., Zavod za varovanje zdravja Republike Slovenije, Center za nalezljive bolezni, Grablovičeva 44, 1000 Ljubljana; prof. dr. Peter Lazar, dr. vet. med., Veterinarska fakulteta, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana; mag. Leon Ščuka, dr. vet. med., Krka d.d. Dunajska 65, 1000 Ljubljana.

Citirati: Ščuka R, Lazar P, Ščuka L. Retrospective survey of the incidence of *Salmonella* serovars over a 10-year period 1979 - 1988. Slov Vet Res 2001; 38 (3): 235-42.

The predominant route is bilateral transmission between man and poultry and not from feedstuffs to poultry and man.

The experience gained during the past few years has shown that a strict and continuous control must even be intensified, during animal breeding, at slaughter and in the handling of meat.

## Uvod

Netifusne salmonеле predstavljajo veliko skupino bakterij, ki lahko povzročijo obolenja (salmonelozo) živali in ljudi, včasih pa tudi obeh (17).

V strokovni literaturi so številni podatki o zapletenih poteh širjenja neprilagojenih salmonel med ljudmi in živalmi in o njihovi razširjenosti v naravi. Avtorji ugotavljajo:

- da salmonele lahko najdemo v vseh živilih, še posebno v živilih živalskega izvora,
- da so pogosto v prebavnem traktu ljudi in živali in se tako živila posredno ali neposredno okužijo,
- da jih najdemo v okolju, v odpadnem materialu, vodi, odpadnih vodah, živalski hrani, v insektih in drugod,
- da se živila (surovine in njihovi proizvodi) lahko okužijo iz teh virov.

Številne so interakcije med salmonelami in živali. Živila so njihova hrana. Rast salmonel v hranljivem substratu je odvisna od številnih zunanjih, notranjih in tehnoloških vplivov. Vendar imajo različne vrste salmonel pogosto različne lastnosti v medsebojni odvisnosti med salmonelami, živali in tehnološkimi dejavniki (10).

Ekologija in epidemiologija neprilagojenih salmonel sta zelo komplicirani, tako da na izkoreninjenje salmoneloz ne moremo misliti.

Številni raziskovalci so poskušali z različnimi laboratorijskimi testi (serotipizacija, fagotipizacija, biotipizacija, občutljivost za antimikrobne snovi, analiza plazmidnega profila) osvetliti povezanost med izvorom, nosilci, potmi okužbe in učinkovitostjo preventivnih ukrepov, identifikacijo sevov salmonel pri povratnih okužbah, prenos z osebe na osebo, sporadične okužbe ter odpornost sevov proti antimikrobnim snovem, da bi rešili epidemiološko uganko salmoneloz, ki je še vedno ena najbolj razširjenih zoonoz in ima posredno močan vpliv na družbeno ekonomiko in produktivnost (2, 8, 11, 15, 19).

Za salmonelozo lahko zbolijo vse vrste domačih živali. Menijo, da je najpomembnejši vir okužb in zastrupitev s hrano pri ljudeh kontaminirano perutninsko meso in jajca oz. živila živalskega izvora (11).

Od leta 1987 dalje se povečuje število okužb s *Salmonello enteritidis*, fagotipom 4. Ponavadi jo izolirajo iz doma pripravljene majoneze in drugih toplotno slabo obdelanih jedi, ki vsebujejo jajca. S salmonelami je lahko okužena tudi pitna voda (5, 7, 13, 16, 20, 25).

Že leta 1973 je Cherubin objavil mnenje, da precenjujemo pomen živil kot vira okužb za ljudi in da gre tudi pri neprilagojenih salmonelah predvsem za prenos s

človeka na človeka, in to tako na neposreden način kot posredno po fekalno-oralni poti. Manifestacija bolezni je odvisna od številnih dejavnikov tveganja (4, 18).

Baumgartner in sod. pa ugotavljajo, da brojlerji kot vir salmoneloz ne predstavljajo večje nevarnosti za potrošnike, saj niso ugotovili korelacije med prevladujočimi sevi salmonel pri brojlerjih (*S. enteritidis*, *S. typhimurium* in *S. infantis*) in pri ljudeh (1).

V. Bole - Hribovšek, ki je v približno enakem obdobju primerjala serovare salmonel, izolirane v veterinarskih in humanih laboratorijih, ugotavlja, da zbrani podatki nakazujejo različna pota širjenja okužb oziroma kontaminacije s salmonelami. Ugotavlja tudi, da je prenos med ljudmi brez posredovanja živali in njihovih proizvodov pogost ter da so bili prašiči redko vir okužbe ljudi s salmonelami in da bi v nekaterih primerih lahko sklepali, da so se živali okužile od ljudi

Rezultati statistične analize prvih izolacij salmonel pri perutnini in ljudeh v Sloveniji v obdobju od leta 1979 do 1988, izoliranih iz krmil, ne podpirajo splošnega mnenja o prehodu salmonel od krmil k človeku, temveč govorijo o velikih možnostih prenosa salmonel pri ljudeh iz drugih virov (22).

Za preprečevanje širjenja netifusnih salmoneloz obstaja na voljo več preventivnih programov, ki na medsektorskem sodelovanju že omejujejo širjenje salmoneloze (9, 12, 23).

### Material in metode

V letih od 1979 do 1988 smo pregledali prve izolacije serovarov neprilagojenih salmonel pri perutnini, v krmilih in pri ljudeh. V tem času smo pri ljudeh izolirali 31067 sevov salmonel, ki smo jih uvrstili v 122 različnih serovarov. Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije zbira na teritoriju zavodov za socialno medicino in higieno v republiki Sloveniji podatke o prvih izolatih salmonel iz materialov človeškega izvora. Salmonela je bila izolirana v blatu bolnikov, kontaktnih nosilcev, npr. zdravih oseb odkritih med epidemijo salmoneloze, in v blatu zdravih oseb med rednimi zdravstvenimi pregledi zaposlenih v prehrabeni dejavnosti (21). Izolacije so izvedli po Edwards-Ewingovi metodi (6).

Pri perutnini je bilo v enakem obdobju ugotovljenih 936 sevov salmonel, ki so pripadali 44 serovarov, v krmilih pa 539 sevov salmonel, ki so bili uvrščeni v 67 različnih serovarov. V perutnini in krmi so salmonelo odkrili med pregledovanjem vzorcev na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete v Ljubljani in na drugih veterinarskih inštitucijah v Sloveniji v letih med 1979 in 1988.

Pri perutnini so pregledovali notranje organe mrtvih živali, valilna in konzumnka jajca, embrie, steljo in rektalne brise. Med krmili so pregledovali uvoženo kostno moko, uvoženo in domačo kostno in mesno moko in različne popolne krmne mešanice (3). Pregledovali so po metodi, opisani v Priročniku za laboratorijsko diagnostiko (14).

Za statistično analizo razlik rangov smo uporabili neparametrični Friedmanov test in upoštevali 10 najpogostejših serovarov, posebej pri človeku, perutnini in v krmi.



Tabela 1: Rangi 10 najpogostejših serovarov salmonel po letih

Leto	1979			1980			1981			1982			1983			1984			1985			1986			1987			1988			Mean rank					
	H	P	F	H	P	F	H	P	F	H	P	F	H	P	F	H	P	F	H	P	F	H	P	F	H	P	F	H	P	F						
<i>Salmonella</i> spp.	10	10	3	9	6	1.5	10	8	4	10	9	6	10	10	6.5	10	10	9	10	9	3.5	10	9	7.5	10	8	3	10	4	2.5	9.9	8.3	4.65			
<i>S. enteritidis</i>	9	9	7.5	10	9	9	9	9	9	10	6	9	8	10	9	9	6.5	9	10	9	10	9	10	3	8	7	2	9	9	6	9.0	9.0	6.8			
<i>S. typhimurium</i>	1	0	0	2	0	0	2	0	0	1	0	0	1	0	1.5	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	3.95	0	0			
<i>S. virchow</i>	3.5	4	0	1	2.5	0	1	2	0	6	2	0	8	3.5	0	8	8	0	8	8	0	8	0	3.5	4	0	7	2	0	5	8	0	5.1	4.4	0	
<i>S. heidelberg</i>	8	4	0	8	5	0	4	6	0	7	7	0	5	9	0	4	6	0	1	7	0	5	8	0	4	5.5	0	4	10	0	5.0	6.75	0			
<i>S. saintpaul</i>	6	4	9	5	10	10	8	10	7	8	7	2.5	7	7	6.5	6	4	6.5	6	4.5	6.5	2	2	3	6	10	4.5	6	4	2.5	6.0	6.25	6.15			
<i>S. agona</i>	7	4	0	7	2.5	0	5	2	0	5	5	0	6	6	0	3	1.5	0	2	3	0	6	6	0	6	0	5	4	0	3	4	0	4.9	3.8	0	
<i>S. infantis</i>	5	0	0	3	0	0	3	0	0	3	0	0	4	0	0	5	0	0	4	0	7	0	0	0	3	0	0	1	0	0	3.8	0	0			
<i>S. java</i>	2	4	0	6	8	0	7	4.5	0	4	2	0	3	5	0	1.5	3	0	3	1	0	1	7	0	1	7	0	1	5.5	0	7	4	0	3.55	4.4	0
<i>S. hadar</i>	3.5	0	3	4	0	1.5	6	0	4	2	0	2.5	1	0	1.5	7	0	3	7	0	6.5	3.5	0	9	2	0	7.5	2	0	2.5	3.8	0	4.1			
<i>S. bredeney</i>	0	4	3	0	2.5	4	0	2	1.5	0	2	2.5	0	2	3	0	1.5	3	0	4.5	1.5	0	5	0	5	0	9	0	4	9	0	3.65	4.15			
<i>S. anatum</i>	0	4	0	0	2.5	0	0	4.5	0	0	7	0	0	1	0	0	7	0	6	0	6	0	2	0	0	2	0	0	4	0	0	4.0	0			
<i>S. livingstone</i>	0	8	0	0	7	0	0	7	0	0	4	0	0	3.5	0	0	5	0	0	2	0	0	2	0	0	0	2	0	0	4	0	0	4.45	0		
<i>S. gallinarum</i>	0	0	7.5	0	0	4	0	0	10	0	0	8.5	0	6.5	0	10	0	0	6.5	0	0	6.5	0	3	0	0	10	0	0	10	0	0	7.6			
<i>S. senftenberg</i>	0	0	10	0	0	4	0	0	7	0	0	2.5	0	0	6.5	0	3	0	0	6.5	0	0	6.5	0	0	6	0	0	4.5	0	6	0	0	5.6		
<i>S. tennessee</i>	0	0	3	0	0	6.5	0	0	4	0	0	2.5	0	0	6.5	0	0	8	0	0	3.5	0	0	7.5	0	0	7.5	0	0	8	0	0	6.3			
<i>S. havana</i>	0	0	6	0	0	8	0	0	1.5	0	0	2.5	0	0	1.5	0	0	3	0	1.5	0	0	10	0	0	1	0	0	2.5	0	0	3.75				
<i>S. newington</i>	0	0	3	0	0	6.5	0	0	7	0	0	10	0	0	6.5	0	0	3	0	0	10	0	0	1	0	0	6	0	0	6	0	0	5.9			
<i>S. derby</i>																																				

Legend: H-človek P-perutnina F-krma

Tabela 2: Korelacijski in delni korelacijski koeficijenti rangov med človekom, perutnino in krmo

Korelacijski koeficijent / leto	1979	1980	1981	1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1979-1988
človek-perutnina	0,827	0,834	0,845	0,891	0,918	0,830	0,798	0,788	0,739	0,781	0,895
človek-krma	0,551	0,538	0,625	0,531	0,641	0,647	0,625	0,496	0,388	0,417	0,644
perutnina-krma	0,545	0,626	0,596	0,530	0,630	0,586	0,537	0,475	0,547	0,469	0,641
človek - perutnina in krma	0,753	0,756	0,753	0,848	0,863	0,729	0,702	0,723	0,683	0,730	0,821
perutnina - človek in krma	0,212	0,036	0,282	0,153	0,203	0,355	0,387	0,225	-0,030	0,092	0,204
krma - človek in perutnina	0,191	0,383	0,164	0,148	0,137	0,116	0,081	0,157	0,420	0,252	0,191

Povezanost rangov med človekom in perutnino, človekom in krmo ter perutnino in krmo smo ocenili na osnovi Spearmanove korelacije rangov ter delnih korelacij za vsako leto posebej in za vsa leta skupaj.

## Rezultati

Za statistično analizo smo uporabili 10 najpogostejših serovarov salmonel pri človeku, perutnini in v krmi. Tabelarni pregled vseh serovarov salmonel s pripadajočimi rangi pri človeku, perutnini in krmi lahko najdemo v literaturi po številcih 5, 23 in 24.

Tabela 3: Friedmanov test razlik med rangi

	$\chi^2$	P	DF
Človek	48,67	P<0,005	9
Perutnina	37,42	P<0,001	9
Krma	16,25	P>0,05 (NS)	9

Legenda:  $\chi^2$  - hi-kvadrat P- verjetnost DF - stopinje prostosti NS-ni statistično značilno

Statistična analiza je pokazala pomembne razlike po letih med pogostnostjo različnih serovarov pri človeku in perutnini, medtem ko je pogostnost serovarov, izoliranih iz krme, iz leta v leto enaka.

Korelacijski in delni korelacijski koeficienti kažejo, da obstaja povezava med pogostnostjo serovarov pri človeku in perutnini, ne pa med krmo na eni ter človekom in perutnino na drugi strani.

## Razprava

Salmoneloza kot kompleksen epizotični in epidemiološki problem danes še ni pojasnjena, čeprav je posamezne člene te verige uspelo osvetliti.

Ker so salmonele vseprisotne, so postale sestavni del mikrobnega ekosistema pri proizvodnji in predelavi živil. S proučevanjem nekaterih bioloških lastnosti serovarov salmonel v laboratorijskih pogojih so ugotovili velike individualne razlike pri posameznih serovarih. Okužbe s salmonelami lahko povzročijo obolenja ali latentne infekcije in jih najdemo slučajno v črevesju mnogih živali in ljudi.

Že dolgo je znano, da je salmoneloza bolezen, ki lahko resno ogrozi živilsko proizvodnjo. Bolezen je pomembna z ekonomskega stališča in zato vedno poudarjamo važnost njenega zatiranja oz. preprečevanja. Vendar pa ta problem ne posega samo v ekonomiko proizvodnje in predelave živil, ampak tudi na zdravstveno področje. Danes je glede pomena salmonel za zdravje ljudi raziskano in jasno že marsikaj, česar pred leti še nismo poznali. Prav zaradi tega je potrebno upoštevati tudi zdravstveni problem salmoneloz in ne samo ekonomskega.

V Sloveniji je bilo do leta 1989 ugotovljenih več kot 150 serovarov različnih salmonel pri ljudeh (21, 24), pri živalih pa nad 80 različnih serovarov neprilagojenih salmonel (3).

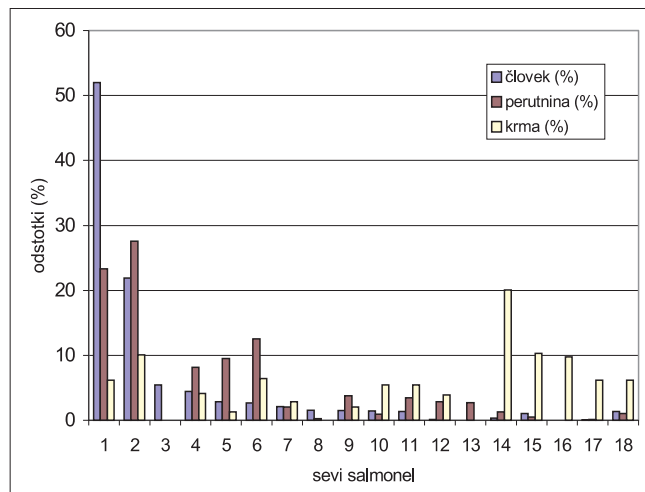
Dvajset od 22 najpogosteje izoliranih serovarov salmonel pri ljudeh je bilo največkrat izoliranih tudi pri perutnini ali v krmilih. Zato menimo, da je v Sloveniji perutnina (oz. živila perutninskega izvora) pomemben vir okužbe ljudi s salmonelami. Vendar se človek okuži tudi iz drugih virov, kajti dobra polovica pri ljudeh ugotovljenih serovarov (72 ali 59,01%), ni bila ugotovljena pri perutnini. Rezultati očitno nakazujejo korelacijo med pogostnostjo serovarov pri človeku in perutnini, medtem ko pogostnost serovarov v krmi ne kaže povezanosti s pogostnostjo pri človeku ali perutnini.

Tabela 4: Primerjava izolatov *Salmonellae* v odstotkih pri človeku, perutnini in v krmi (5, 23, 24)

Število	Serovari	Človek	Perutnina	Krma	Človek (%)	Perutnina (%)	Krma (%)
1	<i>S. enteritidis</i>	14670	197	24	51,96	23,31	6,17
2	<i>S. typhimurium</i>	6180	233	39	21,89	27,57	10,03
3	<i>S. virchow</i>	1533	0	0	5,43	0,00	0,00
4	<i>S. heidelberg</i>	1261	69	16	4,47	8,17	4,11
5	<i>S. saintpaul</i>	803	80	5	2,84	9,47	1,29
6	<i>S. agona</i>	750	106	25	2,66	12,54	6,43
7	<i>S. infantis</i>	584	17	11	2,07	2,01	2,83
8	<i>S. java</i>	428	2	0	1,52	0,24	0,00
9	<i>S. hadar</i>	416	32	8	1,47	3,79	2,06
10	<i>S. bredeney</i>	403	8	21	1,43	0,95	5,40
11	<i>S. anatum</i>	389	29	21	1,38	3,43	5,40
12	<i>S. livingstone</i>	30	24	15	0,11	2,84	3,86
13	<i>S. gallinarum</i>	1	23	0	0,00	2,72	0,00
14	<i>S. senftenberg</i>	92	11	78	0,33	1,30	20,05
15	<i>S. tennessee</i>	295	4	40	1,04	0,47	10,28
16	<i>S. havana</i>	4	0	38	0,01	0,00	9,77
17	<i>S. newington</i>	10	1	24	0,04	0,12	6,17
18	<i>S. derby</i>	384	9	24	1,36	1,07	6,17
	Skupaj	28233	845	389			

Gornje navedbe potrjujeta tudi tabela 4 in graf 1. *S. enteritidis* in *S. typhimurium* sta bili izolirani pri človeku v 73,85 %, pri perutnini v 50,88 % in v krmi v 16,20%. Pogosti serovari (*S. heidelberg*, *S. saintpaul* in *S. agona*) se redno pojavljajo pri perutnini in redko pri človeku. Serovari *S. senftenberg*, *S. tennessee* in *S. havana* so bili pogosti v krmi in občasno ali pa sploh ne pri perutnini in človeku.

Zato menimo, da je potrebno glede na izkušnje zadnjih let nenehni nadzor v reji živali, pri klanju, v mesu in v drugih živalskih proizvodih ter v živilih, ki so lahko vehikli salmonel, še poglobiti. Nenazadnje ne smemo zanemariti tudi priprave hrane v gospodinjstvih.



Graf 1: Odstotek izolatov salmonel

## Literatura

- Baumgartner A, et al. 1992. Salmonella contamination of poultry carcasses and human salmonellosis (1992). Arch. Lebensmittelhyg. 43: 121-148.
- Bole-Hribovšek V. 1993. Serovari salmonel, izoliranih v veterinarskih laboratorijih v Sloveniji od 1979 do 1991, in njihova primerjava s serovari, izoliranimi v humani medicini. ZBVetFak Univ Ljubljana, 30: 2,219-228
- Bole-Hribovšek V. 1994. Poskus epizootiološke analize salmonel, izoliranih iz prašičev v Sloveniji od januarja 1979 do junija 1991. ZBVetFakUniv Ljubljana 31(1/2):35-47
- Borrego, J.J. et al. 1992. Comparison of epidemiological markers of Salmonella strains isolated from different sources in Spain. J. Clin. Microbiol. 30: 3058-3064.
- Brglez, I., Batis J, Mehle J, Josipović J. 1990. Salmonele pri perutnini in v krmilih v Sloveniji. Razdobje 1979-1988. Zb Vet Fak Univ Ljubljana 27: 125-138.
- Cherubin CE. 1973. Salmonellosis in man. Lancet, January 6, 1: 45.
- Guidelines for drinking - water quality. 1996. 2<sup>nd</sup> ed., vol. 2. WHO, Geneva, 18-20.
- Edwards PR, Ewing WH. 1986. Identification of Enterobacteriaceae. 4th ed. Elsevier, New York. 181-318
- Humphrey TJ. 1994. Contamination of egg shell and contents with Salmonella enteritidis: a review. Int. J. Food Microbiol. 21: 31-40.
- In: BERGY'S manual of determinative bacteriology 1986. Baltimore, William & Wilkins. 427-458.
- Mason J. 1994. Salmonella enteritidis control programs in the United States. Int. J. of Food Microbiol. 21: 155-169.
- Matić S. 1982. Utjecaj svojstva namirnica, tehnoloških postupaka proizvodnje i uvjeta čuvanja na aktivnost salmonela u namirnicama, p. 154-167. In: Zbornik radova simpozija Salmoneloze i mogućnost njihova sprečavanja. Zagreb.
- McDonough PL, et al. 1989. Clonal Groups of Salmonella typhimurium in New York state. J. Clin. Microbiol. 27: 622-627.
- Noordhuizen JP, Frankena K. 1994. Salmonella enteritidis: clinical epidemiological approaches for prevention and control of S. enteritidis in poultry production, Int. J. Food Microbiol. 21: 131-143.

15. Perales I, Audicana A. 1989. The role of hen's eggs in outbreaks of salmonellosis in north Spain. *Int. J. Food Microbiol.* 8: 175-180.
16. Priručnik za laboratorijsku diagnostiku. 1984. Savez veterinarar i veterinarskih tehničara Jugoslavije - odbor za izdavačku delatnost, Beograd. 237-249
17. Rodrigue DC, et al. 1992. Comparison of plasmid profiles, phage types, and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella enteritidis* in United States. *J. Clin. Microbiol.* 30: 854-857.
18. Salmon RL, et al. 1991. How is the source of food poisoning outbreaks established? The example of three consecutive *Salmonella enteritidis* PT 4 outbreaks linked to eggs. *J. Epidemiol. Commun. Health* 45: 266-269.
19. *Salmonellae* 1996. In: MICROORGANISMS in food. ICMSH, Blackie Academic & Professional, London, p. 219-225.
20. Schmid H. 1996. Risk factors for sporadic Salmonellosis in Switzerland. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 15: 725-732.
21. Stoehr K, Hoppe B. 1995. Human-to-human transmission of *Salmonella enteritidis*. *Zbl. Hyg.* 197: 543-551.
22. Suzuki S. 1994. Pathogenicity of *Salmonella enteritidis* in poultry. *Int. J. Food Microbiol.* 21: 89-105.
23. Ščuka R. 1992. Prve izolacije salmonel pri ljudeh v Sloveniji v razdobju 1979-1988. *Zb. Vet. Fak. Univ. Ljubljana* 29: 197-207.(abstract)
24. Ščuka R. 1993. Statistična analiza povezave prvih izolacij salmonel (človek - perutnina - krmila) v Sloveniji v obdobju 1979-1988. *Zb. Vet. Fak. Univ. Ljubljana* 30: 159-168.
25. Van de Giessen AW, Ament AJ, Notermans SH. 1994. Intervention strategies for *Salmonella enteritidis* in poultry flocks: a basic approach (1994). *Int. J. Food Microbiol.* 21: 145-54.
26. Zajc-Satler J. 1974. Dvajset let izkušenj v laboratorijski diagnostiki humanih salmoneloz. Premik v epidemiologiji in pomen neprilagojenih salmonel za humano patologijo. *Zb. BiotehFak. Vet.* 11 (suppl 2): 41-50.
27. Živković J, Jaksić S, Mioković B. 1997. *Salmonella* serovars in chickens' meat and chicken meat products in Zagreb, Croatia. *Vet. Arh.* 67: 169-173.

## **CHRONOPHYSIOLOGY OF ARTERIAL BLOOD PRESSURE AND HEART RATE IN ATHLETIC HORSES**

G. PICCIONE, A. ASSENZA, G. ATTANZIO, F. FAZIO, G. CAOLA

Key words: horses; arterial blood pressure; heart rate; chronophysiology; exercise physiology

The study of chronophysiological responses to physical activity involving the athlete's whole organism, is a complex matter as is the functional evaluation of the athlete. We can simplify it by studying the parameters which are indices of functionality, such as maximum oxygen consumption, heart rate, blood lactate and arterial pressure. Recently, sport chronobiology began studying circadian variations in the cardiocirculatory system, which, since they greatly influence the energetic metabolism of the whole organism, can give a good picture of its global functioning. The lack of data on cardiovascular chronophysiology in the domestic species, particularly in the athletic horse, led us to continue the research we had been doing for some time with the aim of learning more about cardiovascular temporal organization in the horse. Specifically, we wanted to study the circasemidian, circadian and circatrigintan rhythms of arterial blood pressure and heart rate in the athlete at rest. Our research, by applying rigorous statistical methodologies, that use periodic mathematical models, made it possible to observe in the athletic horse, rhythmic variations at different frequencies (circasemidian, circadian and circatrigintan) in both systolic and diastolic pressure and in heart rate. The results obtained thus help to identify the temporal interval in which the organism seems to perform best.

## **KRONOFIZIOLOGIJA ARTERIJSKEGA KRVNEGA TLAKA IN SRČNEGA UTRIPA PRI ŠPORTNIH KONJIH**

Ključne besede: konji; arterijski krvni tlak; srčni utrip; kronofiziologija; športna fiziologija

---

Delo je prispelo: 9 marca 2001.

Naslov avtorjev: doc. dr. Giuseppe Piccione, giupiccione@iol.it, dr. Anna Assenza, dr. Giuseppe Attanzio, dr. Francesco Fazio, prof. Giovanni Caola, Dipartimento di Morfologia, Biochimica, Fisiologia e Produzioni animali, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Messina, Strada San Giacomo, 19, 98100 Messina, Italija.

Citirani: Piccione G, Assenza A, Attanzio G, Fazio F, Caola G. Chronophysiology of arterial blood pressure and heart rate in athletic horses. *Slov Vet Res* 2001; 38 (3): 243-8.

Proučevanje kronofiziološkega odziva na telesno aktivnost in funkcionalno ovrednotenje športne živali je kompleksen proces. Poenostavimo ga lahko s preiskovanjem parametrov, ki so pokazatelji dejavnosti, kot so največja poraba kisika, srčni utrip, vsebnost laktata v krvi in arterijski krvni tlak. V zadnjem času so v okviru športne kronofiziologije začeli proučevati dnevna nihanja kardiovaskularnega sistema, saj ta zaradi svojega velikega vpliva na energetskega metabolizem celotnega organizma lahko podajo jasno sliko o splošnem delovanju organizma. Zaradi pomanjkanja podatkov o kardiovaskularni kronofiziologiji pri domačih živalih smo se odločili za nadaljevanje že pred časom začete študije o časovni organiziranosti kardiovaskularnega sistema pri športnih konjih. Zanimali so nas predvsem cirkasemidiani, cirkadiani in cirkatrigintani ritmi arterijskega krvnega pritiska in srčnega utripa pri športni živali med počitkom. V raziskavi smo uporabili rigorozne statistične metodologije s periodičnimi matematičnimi modeli in tako pri športnem konju spremljali ritmične variacije sistoličnega in diastoličnega krvnega tlaka in srčnega utripa pri različnih frekvencah (cirkasemidiani, cirkadiani in cirkatrigintani). Dobljeni rezultati nam omogočajo določitev časovnih intervalov, v katerih organizem verjetno deluje najbolje.

### Introduction

Chronophysiological studies on blood pressure progress have been made on man and laboratory animals, but an accurate examination of the specific literature shows that no research has been carried out on the horse with analytic and specific methodologies.

Numerous studies have been made on man: to define reference standards for the different ages, sex, race and types of activities used to interpret the single values of arterial blood pressure; to evaluate of athletic performance, and together with other cardiovascular parameters which present periodicity at a different frequency (heart rate, capillary resistance and ECG) in the human athlete (12, 13), to know when the alterations of these rhythms are indicative of cardiovascular risk (2).

### Material and methods

Six Sella Italiana breed jumpers from the same stud farm, four females and two geldings, were used for this study. The animals were 10 to 12 years old, with a mean body weight of  $340 \pm 30$  kg, clinically healthy, in training and fed on hay and concentrated food. Feeding took place at 06:00 and at 16:00. Throughout the 30 days of testing, the horses were housed in single naturally lit boxes. During the pre-experimental period they followed a daily 1 hour training programme consisting of a warm up (5 minutes at a walk, 15 minutes at a trot, 3 minutes at a walk, 10 minutes at a gallop) followed by jumps over four 90 to 120 cm high upright fences and four 90 to 120 cm wide fences, including 1 gate, 1 double gate and 1 straight.

A non-invasive system was used to monitor blood pressure and heart rate in all the animals, consisting in a muff placed on the dorsal metacarpal artery and a

personal computer with the DYNA PULSE TM 200 programme. Recordings were made on all the horses at rest, and taken as follows: circasemidian, every 2 hours from 09:00 to 21:00; circadian, every 4 hours from 04:00 to 24:00 and circatrigintan, every 5 days, at 08:00 and at 16:00 for one month (June).

### Statistical analysis

Statistical processing of the data for the various temporal periods was done on the mean values of the recordings made at the different time points, as the intragroup variance was not significant. We applied a trigonometrically statistical model to these values to analytically describe the periodic phenomenon, by individuating the main parameters which characterize it: Mesor (Midline Estimating Statistic of Rhythm), expressed in the conventional unit of the relative parameters with the confidence interval at 95 %, Amplitude (A) expressed in the same unit as the relative Mesor, Acrophase ( $\Phi$ ), calculated by the single Cosinor method and expressed in hours and days, with the confidence interval at 95 %.

## Results

The mean values of the cardiovascular parameters (systolic, diastolic and average blood pressure, and heart rate), expressed in their units of conventional measurement, together with standard deviations, taken at the different time points (every 2 hours, 4 hours and 5 days respectively), were studied in all the horses. The statistical data for these are shown in tables 1, 2 and 3.

Table 1: Average values, with standard deviations, of the pressure parameters and the heart rate, expressed in conventional units of measurement, recorded every 2 hours in the 6 jumpers

Parameter (mmHg)	TIMES OF RECORDING (hours)						
	09:00	11:00	13:00	15:00	17:00	19:00	21:00
Systolic	171.50 ± 10.25	176.17 ± 19.28	184.67 ± 17.25	190.67 ± 19.51	196.00 ± 27.30	187.00 ± 28.19	182.00 ± 16.30
Diastolic	108.50 ± 21.04	110.40 ± 17.90	116.30 ± 11.78	121.40 ± 18.96	123.00 ± 30.20	119.50 ± 25.05	111.60 ± 25.44
Mean	130.50 ± 15.93	128.00 ± 15.30	145.00 ± 8.27	142.17 ± 17.91	152.00 ± 27.17	141.67 ± 23.61	155.33 ± 21.91
Differential	63.00	65.77	68.37	69.27	73.00	67.50	70.40
Heart Rate (beat/min)	55.83 ± 5.38	53.17 ± 7.14	50.50 ± 6.65	50.50 ± 7.63	53.83 ± 8.18	53.90 ± 8.66	54.50 ± 6.86

Table 2: Average values, with standard deviations, of the pressure parameters and the heart rate, expressed in conventional units of measurement, recorded every 4 hours in the 6 jumpers

Parameter (mmHg)	TIMES OF RECORDING (hours)					
	04:00	08:00	12:00	16:00	20:00	24:00
Systolic	200.17 ± 74.41	202.67 ± 18.78	215.40 ± 37.84	214.83 ± 35.71	210.17 ± 26.99	199.50 ± 46.39
Diastolic	125.50 ± 37.14	127.83 ± 14.06	132.00 ± 20.77	129.83 ± 21.39	124.00 ± 24.55	122.50 ± 39.87
Mean	136.17 ± 45.61	153.83 ± 11.43	168.00 ± 25.15	140.83 ± 14.33	147.50 ± 22.86	157.83 ± 39.32
Differential	74.67	74.84	83.40	85.00	86.17	77.00
Heart Rate (beat/min)	52.90 ± 4.88	52.50 ± 8.02	51.00 ± 11.10	50.09 ± 6.48	52.33 ± 3.67	54.09 ± 5.08



Table 3: Average values, with standard deviations, of the pressure parameters and the heart rate, expressed in conventional units of measurement, recorded every 5 days in the 6 jumpers

Parameter (mmHg)	TIMES OF RECORDING (days)					
	5 <sup>th</sup>	10 <sup>th</sup>	15 <sup>th</sup>	20 <sup>th</sup>	25 <sup>th</sup>	30 <sup>th</sup>
08:00 hours						
Systolic	199.00 ± 24.54	190.00 ± 9.57	179.33 ± 24.78	190.17 ± 16.90	197.00 ± 16.07	199.17 ± 8.11
Diastolic	132.17 ± 22.95	119.67 ± 10.84	116.67 ± 9.00	125.00 ± 20.93	143.17 ± 14.09	138.20 ± 7.73
Mean	161.33 ± 22.74	138.17 ± 14.18	132.17 ± 22.05	143.00 ± 23.31	161.50 ± 9.52	145.00 ± 7.74
Differential	66.83	70.33	62.66	65.17	53.83	60.97
Heart Rate (beat/min)	54.83 ± 5.15	55.00 ± 7.01	53.67 ± 6.65	49.83 ± 6.08	50.20 ± 7.00	54.30 ± 8.56
16:00 hours						
Systolic	170.33 ± 23.62	188.67 ± 18.92	209.67 ± 7.28	194.83 ± 14.98	157.83 ± 12.06	155.50 ± 20.65
Diastolic	124.67 ± 14.64	127.00 ± 19.67	130.67 ± 19.69	113.00 ± 10.12	106.50 ± 13.41	117.00 ± 19.26
Mean	139.67 ± 17.88	143.17 ± 24.02	155.67 ± 19.64	125.17 ± 12.02	120.67 ± 16.64	137.67 ± 22.85
Differential	45.66	61.67	79.00	81.83	51.33	38.5
Heart Rate (beat/min)	51.00 ± 6.98	50.00 ± 7.18	53.33 ± 6.95	55.83 ± 4.53	54.95 ± 9.91	50.50 ± 6.62

The application of the periodic model revealed, for all the temporal series studied, the progress of the systolic and diastolic blood pressure and of the heart rate. The acrophases occurred: in the circasemidian period at 13:18 (11:26 - 15:10) for systolic pressure, at 13:18 (12:20 - 14:16) for diastolic pressure and at 17:00 (15:18 - 18:42) for heart rate; in the circadian period at 14:56 (12:24 - 17:28) for systolic pressure, at 12:08 (09:32 - 14:44) for diastolic pressure and at 02:00 (19:16 - 08:40) for heart rate; in the circatrigintan period, measured at 08:00, on 1<sup>st</sup> June (26<sup>th</sup> May - 7<sup>th</sup> June) for systolic pressure, on 29<sup>th</sup> June (26<sup>th</sup> - 3<sup>rd</sup> July) for diastolic pressure, on 8<sup>th</sup> June (3<sup>rd</sup> - 13<sup>th</sup> June) for heart rate, measured at 16:00, on 16<sup>th</sup> June (13<sup>th</sup> - 19<sup>th</sup> June) for systolic pressure, on 11<sup>th</sup> June (2<sup>nd</sup> - 20<sup>th</sup> June) for diastolic pressure and on 22<sup>nd</sup> June (16<sup>th</sup> - 28<sup>th</sup> June) for heart rate.

Table 4: Mesor (M), with fiducial limits (F.L.) at 95 %, Amplitude (A) and Acrophase ( $\Phi$ ), expressed in hours and days with the confidence interval (C.I.) at 95 % of parameters which were periodic during the circasemidian, circadian and circatrigintan period

Parameter	CIRCASEMIDIAN				
	M	(F. L. 95 %)	A	$\phi$	(C.I. 95 %)
Systolic	185.10	(181.40 - 188.81)	10.06	13:18	(11:26 - 15:10)
Diastolic	116.62	(115.06 - 118.18)	7.27	13:18	(12:20 - 14:16)
Heart Rate	52.88	(52.04 - 53.71)	2.39	17:00	(15:18 - 18:42)
CIRCADIAN					
Systolic	207.12	(204.82 - 209.40)	9.11	14:56	(12:24 - 17:28)
Diastolic	126.94	(125.78 - 128.09)	4.53	12:08	(09:32 - 14:44)
Heart Rate	52.15	(51.45 - 52.85)	1.70	02:00	(19:16 - 08:40)
CIRCATRIGINTAN					
08:00 hours					
Systolic	192.45	(188.89 - 196.01)	9.27	1 <sup>st</sup> June	(26 <sup>th</sup> May - 7 <sup>th</sup> June)
Diastolic	129.15	(125.78 - 132.52)	13.16	29 <sup>th</sup> June	(26 <sup>th</sup> June - 3 <sup>rd</sup> July)
Heart Rate	52.97	(51.89 - 54.06)	2.84	8 <sup>th</sup> June	(3 <sup>rd</sup> - 13 <sup>th</sup> June)
16:00 hours					
Systolic	179.45	(115.22 - 124.38)	27.34	16 <sup>th</sup> June	(13 <sup>th</sup> - 19 <sup>th</sup> June)
Diastolic	119.81	(115.22 - 124.38)	11.06	11 <sup>th</sup> June	(2 <sup>nd</sup> - 20 <sup>th</sup> June)
Heart Rate	52.60	(51.42 - 53.78)	2.97	22 <sup>nd</sup> June	(16 <sup>th</sup> - 28 <sup>th</sup> June)

Table 4 shows the results of the periodic measurements and the magnitude of the rhythmic phenomenon for all the temporal series studied during the circasemidian,

circadian and circatrigintan periods. They are shown as: Mesor, expressed in the same conventional unit as the respective parameter and also with fiducial limits at 95 %, Amplitude (A), expressed in the same unit as the relative Mesor and Acrophase ( $\Phi$ ) expressed in hours and days and also with the confidence interval at 95 % for the parameters.

### Discussion

By applying rigorous statistical methodologies, utilising periodic mathematical models, our study revealed the existence of rhythmic events at frequency (circasemidian, circadian and circatrigintan) in systolic and diastolic pressure and in the heart rate of the athletic horse. The temporal organization at medium frequency of the above mentioned parameters, expressed in terms of acrophase (the hours of the day in which the parameter studied reaches its maximum value) seems to be as follows: in the circasemidian and circadian period the systolic and diastolic pressure presented diurnal acrophases and in the circasemidian period the acrophases of both the systolic and diastolic pressure occurred at 13:18 hours. The heart rate presented nocturnal acrophases during both periods. As these results represent a first approach to the chronophysiological study of arterial pressure of these animals, further periodic monitoring of arterial pressure is required to completely define its temporal organisation. It is also needed to individuate its synchronizers, those endogenous or environmental periodic factors which determine the position of the biological rhythm along the temporal scale and which intervene by modifying the parameters of the biorhythm. The application of chronophysiological studies in humans yielded results significant enough to warrant their use in the establishment of a standards of reference for the evaluation of physical performance (12, 13). In athletes, especially, it was noted that the content of some biologically active substances shows some variations throughout the day, which influence the levels of functional capacity. In fact, some authors have observed periodic variations in heart rate measured at rest, in arterial pressure, in  $\text{VO}_2 \text{ max}$ , in lactate concentration and in performance capacity (10, 11, 3, 1). These parameters, which are used for the definition of athletic performance, presented optimal levels at different times of the day. They therefore influence the planning of the training process and of competitive activity and can be especially useful in deciding the type, intensity and duration of daily training. From this it can be deduced that, for the human athlete, the periodicity of the functional systems involved is given due consideration.

While still embryonic, it is clear that a chronogram is emerging from the available data on the temporal organization of some hematochemical and electrocardiographical parameters and the rectal temperature of the horse (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10). However, further research is necessary to build a sufficient physiological profile of the biological temporal structure which would enable the formulation of specific training programmes that take account of the periodic variations in the functional system of the athletic horse.

## References

1. Bugge JF, Opstag PK, Magnus PM. Changes in the circadian rhythm of performance and mood in healthy young men exposed to prolonged, heavy physical work, sleep deprivation and calorific deficit. *Aviat Space Environ Med* 1979; 50: 663-8.
2. Cornélissen G, Scarpelli PT, Halberg F, Halberg J, Halberg Francine, Halberg E. Cardiovascular rhythms: their implications and applications in medical research and practice. In: Hekkens WTJM, Kerkhof GA, Rietveld WJ (eds) *Trends in chronobiology*. Oxford, Pergamon: 1988: 335-55.
3. Illmarinen J, Rutenfranz J, Kulian H, Klimt F. Untersuchungen zur Tagesperiodik verschiedener Kreislauf - und Atemgrossen bei submaximalen and maxilen Leistungen am Fahrradergometer. *Eur J Appl Physiol* 1975; 34: 255-67.
4. Piccione G, Assenza AM, Fazio E, Caola G. Periodicità annuale di alcuni parametri ematochimici nel Puledro purosangue inglese in accrescimento. *Ann Facolt Med Vet (Messina)*, 1993; 30: 47-57.
5. Piccione G, Assenza AM, Caola G. Organizzazione temporale circatrigintana autunnale di alcune attività enzimatiche sieriche nel Cavallo Sanfratellano. *Atti A.S.Sa.V.*, 1995; 2: 181-85.
6. Piccione G, Assenza AM, Giofrè F, Caola G. - Andamento circannuale di alcuni metaboliti azotati, della glicemia e di calcio e fosforo in cavalli di razza Murgese. *Atti Soc It Ippol* 1996; 13: 61-8.
7. Piccione G, Assenza A, Scribano P, Caola G. Organizzazione temporale circasemidiana di alcuni parametri ematochimici, ematologici e della temperatura rettale e cutanea nel Cavallo Purosangue inglese. *Atti A.S.Sa.V.*, 1996; 3: 17-23.
8. Piccione G, Castaldo C, Carta S, Caola G. Study on the circadian rhythmicity of some electrocardiographical parameters in the horse. *Proceedings 5<sup>th</sup> World equine Veterinary Association*, 1997: 65.
9. Piccione G, Fazio F, Caola G. Ematochimica del Cavallo Sanfratellano: Organizzazione temporale circadiana. *Atti Soc It Cron* 1998; 6: 94.
10. Piccione G, Fazio F, Scribano P, Caola G. La temperatura corporea nel Cavallo Sanfratellano: Pattern temporale circasemidiano, circadiano, circatrigintano e circannuale. *Atti Soc It Sci Vet* 1998; 52: 73-4.
11. Reilly T, Robinson G, Minors DS. Some circulatory response to exercise at different times of day. *Med Sci Sports Exerc* 1984; 16: 447-82.
12. Weddige D. Untersuchungen zum Tag-Nacht-Unterschied der körperlichen Leistungs-fähigkeit. *Köln-Porz: Deutsche Forschungs-und Versuchsanstalt für Luft-und Raumfahrt*, 1974: 74-9.
13. Winget CM, DeRoshia CW, Markley CL, Holley DC. A review of human physiology and performance changes associated with desynchronises of biological rhythms. *Aviat Space Environ Med* 1984; 55: 1085-96.
14. Winget CM, DeRoshia CW, Holley DC. Circadian rhythms and athletic performance. *Med Sci Sports Exerc* 1985; 17: 498-516.

**PARNA SPREDNJA VELIKA DOVODNICA (*VENA CAVA CRANIALIS DEXTRA ET SINISTRA*) PRI PSU**

G. FAZARINC, M. URŠIČ, E. LOVŠIN, P. JUNTES

Ključne besede: veterinarska medicina; anatomija; *vena cava cranialis*; pes

V prispevku opisujemo primer parne sprednje velike dovodnice, kar je pri psu razmeroma redek in neobičajen pojav. Desna sprednja velika dovodnica (*v. cava cranialis dext.*) je imela običajen položaj, leva (*v. cava cranialis sin.*) pa je potekala v kavdalni smeri vzporedno z desno ob ventrolateralni strani sapnika, nato prek leve ploskve aortnega loka ter se spustila ventralno med dorzalno ploskvijo levega uhljiča in pljučnim korenem do koronarnega žleba. Tu se je nadaljevala brez izrazitega prehoda v močno razširjen koronarni sinus. Pojav dvojne sprednje velike dovodnice je posledica izostalega razvoja prečne anastomoze med sprednjima kardinalnima venama v obdobju organogeneze. Končni del leve sprednje kardinalne vene ni regresiral, temveč se je izblikoval v levo sprednjo veliko dovodnico, po kateri se je stekala venska kri iz levega sprednjega dela telesa prek koronarnega sinusa v desni atrij.

**PAIRED CRANIAL VENAE CAVAE (*VENA CAVA CRANIALIS DEXTRA ET SINISTRA*) IN THE DOG**

Key words: veterinary medicine; anatomy; *vena cava cranialis*; dog

This paper describes a case of paired cranial venae cavae (*vena cava cranialis dextra et sinistra*), which is a relatively rare occurrence in the dog. The right cranial vena cava (*v. cava cranialis dext.*) was in its usual position, while the left one (*v. cava cranialis sin.*) ran caudally, parallel to the right vessel, along the ventro-lateral side of the trachea, turned across the left aspect of the arch of the aorta and descended ventrally, between the dorsal aspect of the left auricle and the root of the lung, to reach the coronary sulcus. There it continued without any distinct transition to the grossly enlarged coronary sinus. Paired cranial venae cavae occur as a consequence

---

Delo je prispelo: 27. julija 2001.

Naslov avtorjev: dr. Gregor Fazarinc, dr. vet. med., dr. Matjaž Uršič, dr. vet. med., mag. Ester Lovšin, dr. vet. med., Inštitut za anatomijo, histologijo in embriologijo, dr. Polona Juntas, Inštitut za patologijo, sodno in upravno veterinarstvo, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana.

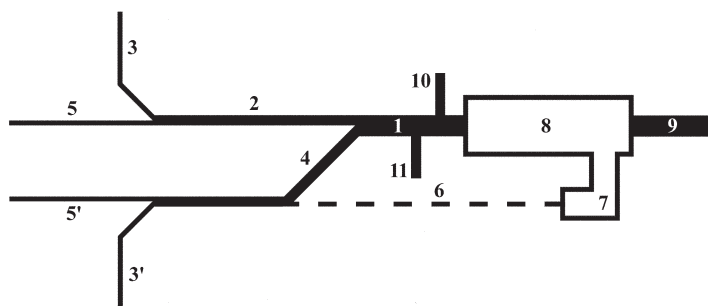
Citirati: Fazarinc G, Uršič M, Lovšin E, Juntas P. Paired cranial venae cavae (*Vena cava cranialis dextra et sinistra*) in the dog. Slov Vet Res 2001; 38 (3): 249-54.

of the non-development of a transverse anastomosis between the cranial cardinal veins during the period of organogenesis. The terminal part of the cranial cardinal vein did not regress but developed into the left cranial vena cava, which carried venous blood from the left cranial part of the animal's body, through the coronary sinus, to the right atrium.

### Uvod

Pri psih se steka venska kri s področja glave, sprednjih okončin in sprednjega dela trupa v parno podključnično (*v. subclavia dext. et sin.*) in parno zunanjo jugularno veno (*v. jugularis externa dext. et sin.*). Obe žili se na vsaki strani pred vhomom v prsno votlino združita v desno oz. levo nadlahtno-doglavno veno (*v. brachiocephalica dext. et sin.*). Desna nadlahtno-doglavna vena poteka premo v kavdalni smeri, leva pa prestopi iz leve na desno stran vratu. Preh vhomom v prsno votlino se združita v sprednjo veliko dovodnico (*v. cava cranialis*). Ta leži ob ventralni ploskvi sapnika, njen kranialni del pa se na levi strani dotika tudi požiralnika. Sprednja velika dovodnica se nadaljuje kavdalno vzdolž prekardialnega mediastinuma, prilega se desni ploskvi aortnega loka ter se nato odpira v stečišče velikih dovodnic (*sinus venarum cavarum*) desnega atrija. Pred njenim izlivom v desni atrij se z dorzalne strani nanjo priključi desna neparna vena (*v. azygos dext.*), z ventralne pa končni neparni del notranje prsne arterije (*v. thoracica interna*) (1) (sl. 1).

Med zgodnjim embrionalnim razvojem se pretaka kri proti srcu prek kardinalnega venskega sistema, ki sestoji iz parnih, simetrično položenih kardinalnih



Slika 1: Shema poteka ven in njihove združitve v sprednjo veliko dovodnico, dorzalni pogled

- 1 sprednja velika dovodnica (*v. cava cranialis*)
- 2, 2' desna in leva nadlahtno-doglavna vena (*v. brachiocephalica dext. et sin.*)
- 3, 3' desna in leva podključnična vena (*v. subclavia dext. et sin.*)
- 4 anastomoza
- 5, 5' desna in leva zunanja jugularna vena (*vv. jugulares ext.*)
- 6 zakrneli del leve sprednje kardinalne vene
- 7 koronarni sinus (*sinus coronarius*)
- 8 stečišče velikih dovodnic (*sinus venarum cavarum*)
- 9 zadnja velika dovodnica (*v. cava caudalis*)
- 10 desna neparna vena (*v. azygos dext.*)
- 11 notranja prsna vena (*v. thoracica int.*)

ven. Iz sprednjih delov embria se steka venska kri po obeh sprednjih kardinalnih venah (vv. *cardinales craniales*). V 6. tednu znotrajmaterničnega razvoja se med levo in desno sprednjo kardinalno veno izoblikuje prečna anastomoza, po kateri steče venska kri iz leve sprednje kardinalne vene v desno. Tako nastane sprednja velika dovodnica, katere ustje se odpira v venski sinus (*sinus venosus*), ki predstavlja zasnovo za desni atrij. Iz ostanka leve kardinalne vene med prečno anastomozo in levim rogom venskega sinusa se razvije koronarni sinus, prek katerega se steka kri iz srčnih ven v desni atrij (2, 3) (sl.1).

Razvojne nepravilnosti venskega sistema pri psih so razmeroma redke in klinično ostanejo največkrat neodkrita, če se ne pojavljajo vzporedno z drugimi srčnimi anomalijami (4, 5). V članku je opisan primer parne sprednje velike dovodnice, ki smo ga opazili med raztelesbo psov pri izvajanju vaj iz predmeta Anatomija domačih živali.

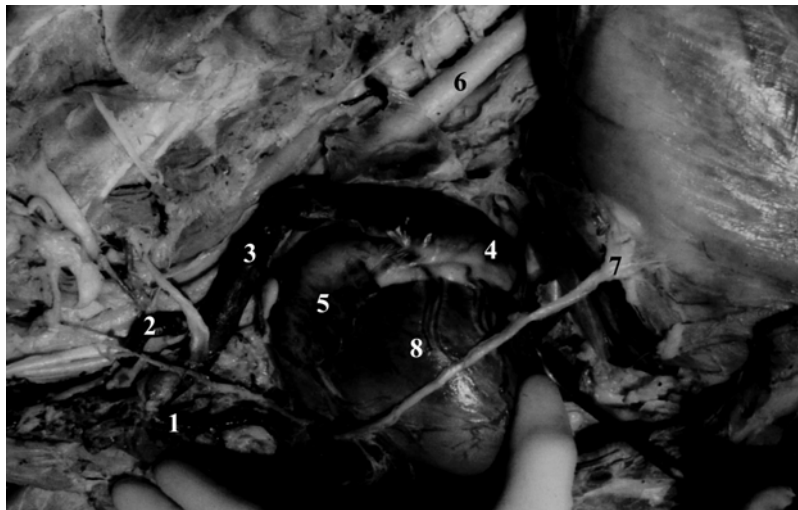
### Opis primera

Pri raztelesbi pasjih kadavrov za študijske namene smo doslej trikrat opazili dvojno sprednjo veliko dovodnico. V dveh primerih sta bila psa odrasla križanca, podobna nemškemu ovčarju, v enem primeru pa je šlo za službenega psa nemškega ovčarja, katerega predniki so bili križani z volkom. Podrobneje opisujemo potek žil pri križancu, podobnem nemškemu ovčarju, težkem okoli 30 kg.

Po odprtju prsnega koša in odstranitvi pljuč smo opazili neobičajno razporeditev žil v prekardialnem delu mediastinuma. Leva in desna nadlahtno-doglavna vena se v kavdalni smeri nista združili v enotno sprednjo veliko dovodnico, temveč sta ločeno vstopili v srce kot dve sprednji veliki dovodnici. Desna je imela v prekardialnem mediastinumu običajen položaj. Ležala je ob desni ventrolateralni strani sapnika. V desni atrij je vstopila z dorzalne strani v višini četrtega rebra. Leva sprednja velika dovodnica pa je potekala vzdolž prekardialnega mediastinuma vzporedno z desno na nasprotni strani sapnika, nato pa je zavila dorzavno do leve ploskve aortnega loka ter se spustila ventralno med dorzalno ploskvijo levega uhljiča in pljučnim korenem do koronarnega žleba (sl. 2). V koronarnem žlebu je zavila okoli zadnjega roba srca in se nadaljevala brez izrazitega prehoda v močno razširjen koronarni sinus, katerega ustje se je odpiralo v desni atrij s kavdalne strani in je bilo neposredno pod ustjem kavdalne velike dovodnice. Desna sprednja velika dovodnica je bila nekoliko debelejša od leve (sl. 3), vendar pa tanjša, kot je običajno sprednja velika dovodnica pri psu primerljive velikosti. Pri raztelešenju nismo opazili tanke prečne anastomoze ali njenih ostankov med sprednjima velikima dovodnicama.

### Razprava

Parna sprednja velika dovodnica je običajna pri nekaterih vrstah sesalcev, kot so slon, zajec, žužkojede vrste živali, netopirji, vrečarjih idr. (6). Pri teh živalskih vrstah se šteje enojna sprednja velika dovodnica za anatomsko posebnost (7). Pri drugih vrstah sesalcev je pojav parne sprednje velike dovodnice največkrat posledica izostalega oziroma neobičajnega razvoja prečne anastomoze med sprednjima



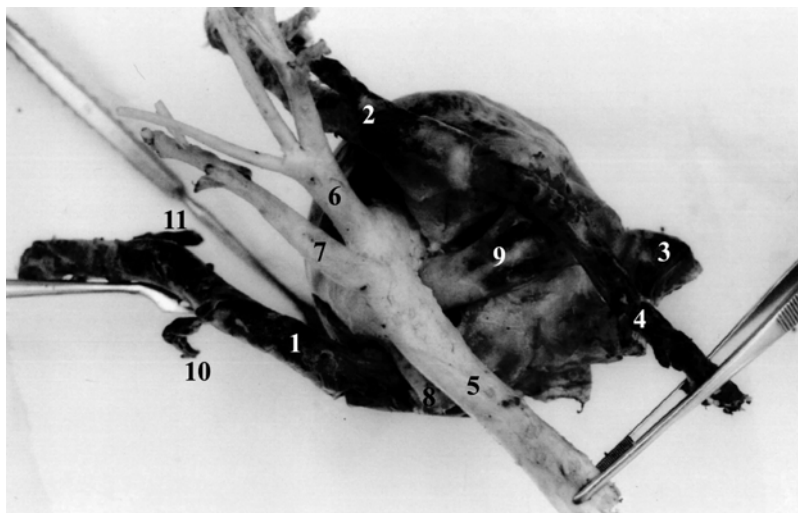
Slika 2: Srce *in situ* z levo sprednjo veliko dovodnico po odstranitvi levega pljučnega krila

- 1 notranja prsna vena (*v. thoracica interna*)
- 2 rebno-vratna vena (*v. costocervicalis*)
- 3 leva sprednja velika dovodnica (*v. cava cranialis sin.*)
- 4 koronarni sinus (*sinus coronarius*)
- 5 levi uhljič (*auriculus sin.*)
- 6 prsna aorta (*aorta thoracica*)
- 7 preponski živec (*n. phrenicus*)
- 8 levi prekat (*ventriculus sin.*)

kardinalnima venama. Kavdalno nadaljevanje leve kranialne kardinalne vene zato ne regresira, temveč se izoblikuje v levo sprednjo veliko dovodnico, po kateri se steka venska kri iz levega sprednjega dela telesa v močno razširjen koronarni sinus in prek njega v desni atrij (8).

Pri psih so posebnosti v razvoju sprednjega sistema velikih ven redke. Po Sekelesu (9) je bilo do leta 1982 dokumentiranih 39 primerov različnih oblik nepravilnosti v razvoju kranialnega sistema velikih dovodnic. Mednje sodita poleg parne sprednje velike dovodnice tudi različici, kot sta prisotnost prečne anastomoze med sprednjima velikima dovodnicama in zakrnelost desne sprednje kardinalne vene namesto leve. V tem primeru se razvije le leva sprednja velika dovodnica, ki zbira vensko kri iz celotnega sistema sprednjih velikih ven in jo odda prek močno razširjenega koronarnega sinusa v desni atrij (3, 10, 11). Od naštetih anatomskih posebnosti so, podobno kot pri ljudeh, najpogostejši primeri parne sprednje velike dovodnice brez anastomoze, redkejši pa so primeri z anastomozo med sprednjima velikima dovodnicama in primeri, ko je razvita le leva sprednja velika dovodnica (9). Na Inštitutu za anatomijo, histologijo in embriologijo smo v zadnjih petnajstih letih pri raztelesbi največ 120 pasjih kadavrov trikrat naleteli na dvojno sprednjo veliko dovodnico, kar kaže, da se ta pojavlja pri 2,5 % psov. Ta podatek precej odstopa od navedb v literaturi, po katerih se pojavlja dvojna sprednja velika dovodnica pri 0,04 do 1,0 % psov (1). Pri psih pred usmrtitvijo niso bila opažena klinična znamenja





Slika 3: Spreparirano srce psa z velikimi dovodnicami in odvodnicami, sprednja velika dovodnica je parna, dorzalni pogled.

- 1 leva sprednja velika dovodnica (*v. cava cranialis sin.*)
- 2 desna sprednja velika dovodnica (*v. cava cranialis dext.*)
- 3 zadnja velika dovodnica (*v. cava caud.*)
- 4 desna neparna vena (*v. azygos dext.*)
- 5 prsna aorta (*aorta thoracica*)
- 6 nadlahtno-doglavno deblo (*tr. brachiocephalicus*)
- 7 leva podključnična arterija (*a. subclavia sin.*)
- 8 leva pljučna arterija (*a. pulmonalis sin.*)
- 9 desna pljučna arterija (*a. pulmonalis dext.*)
- 10 rebčno-vratna vena (*v. costocervicalis*)
- 11 notranja prsna vena (*v. thoracica int.*)

srčne oslabeledosti. Stanje se namreč klinično izraža šele v tistih primerih, ko posebnosti v razvoju kranialnega sistema velikih ven spremljajo tudi druge prirojene napake v poteku žil in zgradbi srca, kot so defekti ventrikularnega pretina, prehodni *ductus arteriosus*, displazija trikuspidalnih zaklopk in tridelni desni atrij (8, 12). Zato domnevamo, da se pojavlja dvojna kranialna vena pogosteje, kot kaže število v literaturi dokumentiranih primerov, verjetno pa večina primerov ostane neodkritih.

#### Literatura

1. Hutton PH. The presence of a left cranial vena cava in a dog. *Brit Vet J* 1969; 125: 21-2.
2. Rüsse I, Sinowatz F. *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere*. Berlin; Hamburg: Parey, 1991: 231-4.
3. Langmann J. *Medical embryology*. 3. ed Baltimore: Williams and Wilkins, 1979: 241-51.
4. Evans HE, Christensen GC. *Miller's anatomy of the dog*. 2. ed. Philadelphia: Saunders, 1979: 760.
5. Williams PL, Warwick R. *Gray's anatomy*. 36. ed. Churchill Livingstone, 1980: 666.
6. Schaller O. Die Vena cava cranialis sinistra persistens bei unseren Haussäugetieren, insbesondere den fleischfressern. *Zeitschr Anat Entwicklungsge* 1955; 119: 131-55.
7. Myckowski K. Rare variation of the venae cavae cranialis in rabbit, dog, cat and calf. *Fol Morphol* 1960; 11: 31-40.



8. Palacio MJF. Persistent left cranial vena cava associated with multiple congenital anomalies in a six-week-old puppy. *J Small Anim Pract* 1997; 38: 526-30.

9. Sekeles E. Double cranial vena cava in a cow: case report and review of the literature. *Zbl Vet Med A* 1982; 29: 494-503.

10. Wyrost P. A rare case of left anterior vena cava (vena cava cranialis sinistra persistens) in a dog. *Fol Morphol* 1968; 1968: 118-21.

11. Palacio MJF, Bayon A, Agut A. Dilated coronary sinus in a dog with persistent left cranial vena cava. *Vet Radiol Ultrasound* 1997; 38 (5): 376-9.

12. Tobias AH, Thomas WP, Kittleson MD, Komtebedde J. Cor triatriatum dexter in two dogs. *J Am Vet Med Ass* 1993; 202: 285-90.



**PROF. DR. LEO RIGLER**  
(1914 - 2001)  
*IN MEMORIAM*

Profesorja Riglerja poznamo večinoma z akademske plati. Številne generacije nekdanjih študentov (28 jih je bilo) se ga spominjajo kot učitelja, ki sta ga odlikovala izreden spomin in do podrobnosti preiščljena dikcija govora. Manj znane so njegove naloge, ki jih je opravljal pri vodenju nekdanjega Veterinarskega oddelka BF UL, morda še manj pa poznamo njegovo življenjsko obdobje, povezano z NOB in delovanjem po drugi svetovni vojni. Profesor Rigler je bil velik domoljub in Slovenec, srce pa je imel odprto; med vojno in po njej nastalo tovarištvo je gojil še dolga leta, verjetno do smrti. V Sarajevu je doživel svojo veliko ljubezen. Po pisnem sporočilu hčerke Vlaste, por. Bojko, povzemamo, da je v času službovanja na Veterinarski vojni bolnici v Sarajevu spoznal Branko Bratoljić. Poročila sta se maja 1941 in živela pri njenih starših. V zakonu sta se jima rodila sin Milenko (maja 1944 v Sarajevu) in kasneje hčerka Vlasta (v Ljubljani marca 1951). Po osvoboditvi 1945 je bil premeščen v Srbijo, v Valjevo, kamor se je preselil z družino, leta 1946 pa je bil na lastno željo premeščen v Slovenijo. V Idriji je služboval leto in pol, nakar je bil premeščen v Ljubljano. Tu je doživel vrhunec svojega delovanja.

Leo Rigler se je rodil 19. aprila 1914 v Hotiču pri Litiji. Na klasični gimnaziji v Ljubljani je maturiral leta 1932 in se istega leta vpisal na študij veterinarstva v Zagrebu. Diplomiral je leta 1939, nato je bil do aprila 1941 vojaški veterinar v Sarajevu, zatem pa je sledilo obdobje brez zaposlitve. Novembra 1941 je dobil službo kot veterinarski pripravnik na sarajevskem okraju. Septembra 1944 je vstopil v NOV. Bil je v veterinarski bolnici 5. korpusa NOV in POJ, nato šef veterinarske službe pri

4. diviziji in zatem pri 8. diviziji, vse do leta 1947, ko je bil, kot že rečeno, premeščen v Ljubljano na tedaj ustanovljeno vojaško veterinarsko šolo. Tu je bil šef odseka za pouk, šest let pa je predaval anatomijo in fiziologijo domačih živali. Isto tematiko je predaval nekaj let tudi na srednji veterinarski šoli v Ljubljani. Leta 1948 je začel z znanstvenoraziskovalnim delom na Zavodu za rentgenologijo in fizikalno terapijo pri Veterinarski fakulteti v Zagrebu pri prof. dr. S. Rapiću, kjer je opravil doktorsko disertacijo z naslovom Širina rentgenske zglobne pukotine na zglobovima ekstremiteta u konja. Leta 1951 je bil promoviran za doktorja veterinarskih znanosti, 1953 pa na lastno željo demobiliziran kot rezervni major veterinarske službe. Zaposlil se je pri OLO Ljubljana kot eksponirani okrajni veterinar s sedežem v Ivančni Gorici, od 1955 do 1959 pa je bil zaposlen na ObLO Ljubljana Rudnik kot občinski in pooblaščen okrajni veterinarski inšpektor.

Leta 1956, ko se je vpisala prva generacija študentov, ali že celo leta 1954<sup>1</sup>, so ga matiçarji veterinarskega oddelka pri Fakulteti za agronomijo, gozdarstvo in veterinarstvo v Ljubljani povabili, da prevzame predmet Anatomija domačih živali. Tri leta je predaval kot honorarni predavatelj, junija 1959 pa je bil izvoljen v naziv univerzitetnega profesorja za ta predmet. Tedaj je presegal nihanje med delom v veterinarski službi in na fakulteti ter se dokončno in v celoti posvetil karieri univerzitetnega učitelja in veterinarski anatomiji. Leta 1965 je bil na študijskem potovanju po Češki in Poljski. Ogledal si je anatomske inštitute veterinarskih fakultet v Brnu, Vroclavu in Varšavi ter se seznanil z njihovim delom.

V času svojega izjemno plodnega dela na fakulteti je v obdobju 1962-1984 napisal skripta iz osteologije in sindezmiologije, miologije, splahnologije, angiologije in kože ter nevrologije<sup>2</sup>. K temu je treba dodati še delo Topografska anatomija psa iz leta 1965 (prevod), Slikovno prilogo k miologiji (skupaj z Janezom Plestenjakom) in Slikovni priročnik za anatomijo domačih živali leta 1983 (skupaj s prof. dr. Brankom Rebeskom, pripravljeno po delu Ellenberger/Baum: Handbuch der vergleichenden Anatomie der Haustiere; založila Državna založba Slovenije). Sodelavci prof. dr. B. Rebesko, prof. dr. L. Rigler, prof. dr. M. Zobundžija in prof. dr. Ž. Janković pa so nato pripravili slikovni priročnik anatomije domačih živali z latinskimi, slovenskimi, hrvaškimi in srbskimi anatomske izrazi (Državna založba Slovenije Ljubljana-Zagreb-Beograd, 1986).

Poleg obsežnega dela, povezanega s pisanjem učnih pripomočkov za študij veterinarstva je profesor Rigler opravil zanimivo in razmeroma obsežno raziskovalno

<sup>1</sup> Iz pisma dr. Lea Riglerja z dne 18. 7. 1954, ki ga je pisal dr. Albinu Sedeju, enemu od matiçarjev Veterinarskega oddelka FAGV, povzemam naslednje: "Prejšnji ponedeljek, ko sem bil pri vas, sem načelno sprejel ponudbo za specializacijo iz anatomije. Med tem časom pa sem mnogo premišljeval o stvari in prišel do prepričanja, da ne bi mogel izpolnjevati postavljenih pogojev in uspešno opravljati poverjene naloge na tako odgovornem mestu. Zato sem se odločil, da vas o dokončni spremembi mojega stališča obvestim. Obenem vas prosim, da o tem poročate na seji matiçarjev, dne 20. t. m., katere se, žal, ne morem udeležiti ...". Iz tega pisma je mogoče povzeti, da so matiçarji Veterinarskega oddelka cenili anatomsko znanje in predavateljske sposobnosti dr. Riglerja in ga že na začetku svojega delovanja predvidevali za nosilca predmeta Anatomija domačih živali. On pa je okleval in nihaval med zaposlitvijo v veterinarski službi in na univerzi. Tedaj se je odločil za službo veterinarskega inšpektorja. Naj dodamo, da je IS LRS izdal dekret o ustanovitvi Veterinarskega oddelka pri Fakulteti za agronomijo, gozdarstvo in veterinarstvo 12. junija 1953, Svet za prosveto in kulturo LRS pa je imenoval matiçarje Veterinarskega oddelka leto kasneje, 9. junija 1954.

delo. Nekatera njegova odkritja so našla svoje mesto v svetovni anatomski literaturi. Proučeval je predvsem avtonomno živčevje pri psu, zlasti jetrni pletež pri eksperimentalni periarterialni hepatični nevrektomiji, arterijsko ožiljenost jeter, vpliv periarterialne hepatične nevrektomije na inzulinski aparat v trebušni slinavki, simfizo spodnje čeljustnice pri govedu, vomeronazalni organ pri prašiču, pa tudi skelet in živce glave idr. Posebej velja omeniti spoznanja iz raziskave simfiznega stika pri več kot 500 govejih spodnjih čeljustnicah, spoznanja o zgradbi in funkciji tega stika. Rezultate te študije je prikazal v več člankih, med drugim tudi v razpravi, ki jo je objavil časopis *Anatomischer Anzeiger* leta 1968. Zanimiva in nazorna je njegova misel, ki jo je strnil v članku, objavljenem v Zborniku Biotehniške fakultete Univerza v Ljubljani, Veterinarstvo (1983), in nato v Veterinarskih novicah leta 1985 (Nekaj pripomb k definiciji intermandibularne artikulacije pri prežvekovalcih): "Avtor zagovarja svoje mnenje, da je treba v skladu z novejšimi ugotovitvami o strukturi intermandibularne artikulacije definicijo le-te v novih učbenikih anatomije dopolniti, v korist napredka funkcionalne anatomije domačih živali pa registrirati obstoj navzkrižnih vezi med mandibularnima polovicama, *ligg. cruciata intermandibularia*, pri domačih prežvekovalcih."

Raziskovalno delo profesorja Riglerja lahko zaokrožimo v štiri obdobja. V prvem, tj. v času pred zaposlitvijo na fakulteti, je bil predvsem klinično orientiran (npr. disertacijsko delo, 1951, ter članka Slučaj puerperalne eklampsije kod kobile, 1954, in Prilog klinici i terapiji otrovanja konja sumpornim dioksidom sa osvrtom na primenu i djelovanje eteričnog terpentinskog ulja, 1954, pri obeh člankih skupaj s F. Čosičem,). Sledilo je obdobje sodelovanja s patologom prof. dr. I. Lenartom z Medicinske fakultete v Ljubljani in kolegom prof. dr. V. Simčičem s Klinike za mesojede. Proučevali so posledice eksperimentalne periarterialne hepatične nevrek-

<sup>2</sup> Seznam skript in drugih knjižnih publikacij, prikazan kronološko:

- Anatomija domačih živali. 1. del. Avtorski zapiski s predavanj. Ljubljana 1961. 172 str.
- Anatomija domačih živali. 1. del. Skripta. Ljubljana: Univerza, 1962. 172 str.
- Topografska anatomija psa. Prevod iz angleščine. Ljubljana: Univerza, 1965, 362 str. (ponatis 1982)
- Anatomija domačih živali. Osteologia in syndesmologia. Skripta. Ljubljana: Univerza, 1968. 214 str. (ponatis 1977, 1983, 1990, 2000)
- Anatomija domačih živali. Myologia. Skripta. Ljubljana: Univerza, 1968. 319 str. (ponatis 1978, 1980, 1984, 1995)
- Anatomija domačih živali. Splanchnologia. Skripta. Ljubljana: Univerza, 1970. 395 str. (ponatis 1983, 1987, 2000)
- Anatomija domačih živali. Slikovna priloga k miologiji. Ljubljana: Univerza, 1970. 112 str. (skupaj z J. Plestenjakom).
- Anatomija domačih živali. Neurologia in aesthesiologia. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, 1980. 339 str. (ponatis 1988, 1994)
- Anatomija domačih živali. Angiologia in integumentum commune. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, 1982. 522 str. (ponatis 1992)
- Slikovni priručnik za anatomijo domačih živali. Ljubljana: DZS, 1983. 337 str. (B. Rebesko, L. Rigler).
- Latinsko-slovensko veterinarsko anatomsko izrazje. Nomenclatura anatomica veterinaria latino-slovenica. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, 1984. 233 str.
- Veterinarski anatomski slovar. Index verborum anatomicorum veterinariorum. Ljubljana: ZRC SAZU, 1985. 270 str.
- Slikovni priručnik anatomije domačih živali. Anatomiae animalium domesticorum manuale graphicum. Ljubljana: DZS, 1986. 347. str. (B. Rebesko, L. Rigler, M. Zobundžija, Ž. Janković).

tomije pri psu in o tej problematiki objavili 6 člankov v obdobju 1962 - 1967, od tega 5 v reviji *Lyon chirurgical*. Skupaj z V. Simčičem in asistentom J. Lorgjerjem je leta 1969 objavil v *ZbBF Vet.* članek Ekscizija jetrne arterije pri psu. Eksperimentalna študija. V obdobju 1966 - 1976 se je profesor Rigler z veliko vnemo lotil proučevanja podčeljustnične simfize pri govedu in o tej problematiki objavil 7 člankov, pri 6 člankih v sodelovanju s prof. dr. B. Mlinškom. Za četrto obdobje (1983 - 1986) so značilni članki (skupaj 9) s področja anatomske terminologije, predvsem o neustreznosti imen za nekatere možganske živce. Med drugim je opozoril na razlike med humano in veterinarsko slovensko anatomsko nomenklaturo (MedR 1984). V tem obdobju je profesor Rigler sklenil svoje obsežno znanstvenoraziskovalno delo na področju anatomije s primerjalno študijo dorzalne poševne zrkelnice mišice in njenega škripca pri psih, prašičih, govedih in konjih. Delo je objavil v soavtorstvu z doc. dr. J. Lorgjerjem v Veterinarskem zborniku Biotehniške fakultete leta 1985. Svojo, v marsičem samorastniško kariero univerzitetnega anatoma, je sklenil s člankom *Further investigations into the unsuitability of certain Latin anatomical names* (*Folia Anatomica Iugoslavica* 1986). Če se spomnimo, da je v tem letu izšel tudi Slikovni priročnik anatomije domačih živali z latinskimi, slovenskimi, hrvaškimi in srbskimi anatomske izrazi, bi lahko ugotovili, da je profesor Rigler živo deloval še po svoji upokojitvi in pomembno prispeval k jugoslovanski veterinarski anatomiji. Kot član Zdrženja anatomov Jugoslavije se je v obdobju 1962 - 1985 z referati udeležil vrste kongresov in drugih znanstvenih srečanj.

Od leta 1963 naprej je bil dolgo obdobje dejaven član veterinarske terminološke komisije pri SAZU. Objavil je vrsto pomembnih del s terminološko tematiko, npr. Latinsko - slovensko veterinarsko anatomske izrazje (Univerza v Ljubljani, 1984) in Veterinarski anatomske slovar (SAZU, 1985). Na 20. kongresu Zveze društev anatomov Jugoslavije v Novem Sadu leta 1985 je bil izvoljen za predsednika komisije za anatomske nomenklaturo pri Zvezi. Terminološki komisiji pri svetovni zvezi veterinarskih anatomov je predlagal nekaj izboljšav anatomskega izrazja. Kot lektor in korektor Veterinarskih novic ter s svojimi pisnimi prispevki je veliko prispeval k podobi tega glasila Zveze društev veterinarjev in veterinarskih tehnikov SRS. Njegovi prispevki o lepi slovenščini so pritegnili pozornost veterinarjev, odmevali pa so tudi pri jezikoslovcih. Opozarjal je na pomanjkljivosti in napake našega strokovnega pisanja.

Profesor Rigler si je prizadeval za napredek študija in nekdanjega veterinarskega oddelka, predhodnika današnje Veterinarske fakultete, kot namestnik predstojnika veterinarskega oddelka BF (1961-1964), predsednik študijske (1965-1967) in kadrovske (1970-1972) komisije in še nekaterih teles na veterinarskem oddelku. Bil je mentor in organizator t.i. izrednega študija veterinarstva v letih 1961-1968. Od leta 1963 do 1979 je bil predstojnik Inštituta za anatomijo, histologijo in embriologijo.

Za svoje delo in prizadevanje je prejel več priznanj na Biotehniški fakulteti in pri Zdrženju anatomov Jugoslavije. Bil je nosilec dveh državnih odlikovanj: reda zasluge za narod s srebrnimi žarki in reda dela z zlatim vencem. Leta 1989 je bil izvoljen za častnega člana Zveze društev veterinarjev in veterinarskih tehnikov SR Slovenije. Leta 1997, ob svojem 83. rojstnem dnevu, je prejel najvišje odličje Veterinarske fakultete, plaketo za delo in zasluge pri osnovanju in uveljavitvi študija

veterinarstva na Univerzi v Ljubljani ob 40-letnici študija veterinarstva in pričetka delovanja Inštituta za anatomijo, histologijo in embriologijo. Odličje je namenjeno posameznikom, ki so s svojim delom vidno prispevali k napredku in uveljavljanju fakultete na področju raziskovalnega, pedagoškega, organizacijskega in drugega dela.

Profesor dr. Leo Rigler se je upokojil s 1. januarjem 1984. Sedaj se je njegov življenjski krog sklenil, preminil je 25. 2. 2001. Minile so radosti in skrbi, marsikaj bo poniknilo v pozabo. Toda bogato nas je obdaril. Zapustil je obsežen opus del, ki še vedno koristijo študentom in stroki. V zgodovino slovenskega veterinarstva se je zapisal z zlatimi črkami. Utemeljil je študij veterinarske anatomije, Inštitut za anatomijo, histologijo in embriologijo pa je vodil s posebno ljubeznijo, o čemer priča naslednje posvetilo na portretni fotografiji, ki jo je podaril Inštitutu ob odhodu v pokoj: *"Ta, meni dragi Inštitut, v katerem sem delal za njegov napredek mnogo let z veliko ljubeznijo, naj na veke živi, vedno naj se razvija in cvete, nikdar naj ne premine!"* Posvetilo je napisano tudi v latinščini. Sodelavci z Inštituta smo profesorju Riglerju hvaležni za njegovo obsežno delo, s katerim je postavil čvrst temelj sodobni slovenski veterinarski anatomiji. V našem spominu ostaja kot dober in težko dosegljiv vzor.

Prof. dr. Srdan V. Bavdek



## DOKTORSKE DISERTACIJE NA VETERINARSKI FAKULTETI UNIVERZE V LJUBLJANI

### Izvillečki

**Vlasta Jenčič:** HUMORALNI IMUNSKI ODZIV ŠARENKE NA STIK Z *AEROMONAS SALMONICIDA* OB UPORABI PROBIOTIKA - IMUNOSTIMULATORJA

V laboratorijskih razmerah smo proučevali humoralni imunski odgovor šarenke (*Oncorhynchus mykiss*) na stik z *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, povzročiteljico furunkuloze pri postrvi. Imunost šarenk smo proučevali v zimskem in poletnem obdobju. V obeh poskusih smo primerjali imunski odziv šarenk, hranjenih s komercialno hrano, ki smo ji dodali imunostimulator ascogen, in šarenk, hranjenih zgolj s komercialno hrano. Večje skupine rib v poskusu smo vakcinirali s komercialno vakcino Furovac 5, manjše skupine rib pa orientacijsko tudi z dvema vrstama vakcin, ki smo ju sami pripravili. Vakciniranim ribam smo v določenih časovnih intervalih jemali kri za serološke preiskave. Za ugotavljanje protiteles proti *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* smo uporabljali test ELISA, aglutinacijo v mikropipetah - kapilarah in imunofluorescenco ter primerjali rezultate. Ugotovili smo, da so rezultati pri vseh treh metodah podobni, najbolj primerljivi pa so bili rezultati testa ELISA in aglutinacije v kapilarah. Aglutinacija v kapilarah je sicer dolgotrajnejša metoda, vendar preprostejša in cenejša, zato bi jo lahko uporabljali v praksi za ugotavljanje imunosti rib po vakcinaciji. Da bi ocenili dejansko imunost rib proti furunkulozi, smo poskus zaključili z okužbo vakciniranih in nevakciniranih rib z bakterijo *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* s številom bakterij, ki smo ga določili v predposkusih ugotavljanja obolenosti šarenk. Imunost, izraženo s protitelesi v krvnem serumu, smo primerjali z dejansko zaščito proti furunkulozi. V zimskem poskusu smo humoralno imunost šarenk primerjali z imunostjo potočnih zlatovčic (*Salvelinus fontinalis*).

Ugotovili smo, da je vakcinacija postrvi s komercialno vakcino dovolj učinkovita, boljšo imunost pa smo dosegli z vakcinama, ki smo ju pripravili sami. Tudi večina skupin vakciniranih rib, ki smo jim v hrano dodajali ascogen, je pridobila boljšo imunost kakor pa ribe, ki smo jih hranili s komercialno hrano. V naših raziskavah smo tudi ugotovili, da so imele vse skupine rib, hranjene z dodatkom ascogena, učinkovitejše naravne obrambne mehanizme in boljšo rast kot ribe, hranjene zgolj s komercialno hrano.

*Delo je bilo opravljeno na Inštitutu za zdravstveno varstvo in gojitev divjih živali, rib in čebel Veterinarske fakultete v Ljubljani.*

*Datum javnega zagovora:* 17. februar 2000.

*Mentor:* prof. dr. Janez Mehle.

**Igor Gruntar:** PREUČEVANJE ANTIGENSKE ZGRADBE IN INFEKTIVNOSTI CISTIČNIH OBLIK SPIROHETE *BORRELIA GARINII*

V destilirani vodi pripravljene cistične oblike spirohete *Borrelia garinii* (*B. garinii*) so se po proteinskem profilu in antigeni strukturi bistveno razlikovale od vegetativnih oblik iste spirohete. Za ciste je bilo značilno bistveno zmanjšano število beljakovin, med katerimi sta bila najmočnejše izražena OspA in flagelin. To sta bila tudi edina ugotovljena antigena pri cistah, prepoznali pa smo ju tudi z ustreznimi monoklonskimi protitelesi. Z barvanjem z barvili BacLight® smo ugotovili morfološko spreminjanje cist med staranjem vodne kulture, ki bi lahko odražalo alternativni življenjski krog *B. garinii* v cistični obliki. Ciste so se v razmerah *in vitro* preobrazile v gibljive spirohete celo po štirih tednih vodne kulture kakor tudi po zamrzovanju le-te. Uspešna izolacija gibljivih spirohet iz miši po intraperitonealni inokulaciji cist potrjuje, da so borelijske cistične oblike infektivne.

Odpornost cist in njihova zmožnost preobrazbe v gibljive spirohete tako *in vitro* kot *in vivo* dokazujeta, da bi za pogosto neuspešnost antibiotične terapije ter za značilne ponavljajoče se izbruhe lymške borelioze lahko bile odgovorne prav cistične oblike. Rezultati hkrati nakazujejo možnost preživetja



in infektivnost teh struktur tudi v naravnem vodnem okolju, kar pa seveda zahteva in opravičuje intenzivne dodatne raziskave.

*Delo je bilo opravljeno na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete v Ljubljani in v Laboratoriju za spirohete Inštituta za biomedicinske znanosti Univerze v Trstu*

*Datum javnega zagovora: 27. marec 2000.*

*Mentor: prof. dr. Janez Mehle.*

#### **Igor Klobučar:** VPLIV ZMANJŠANE DEJAVNOSTI ŠČITNICE NA RAZVOJ MOD PRI PRAŠIČU

Velikost mod in njihova sposobnost tvoriti semenčice pri spolno zrelem samcu se določijo že v fetalnem in zgodnjem postnatalnem obdobju, pogojuje pa ju število sertolijevih celic. Raziskovalci so ugotovili, da eksperimentalno zmanjšana dejavnost ščitnice v fetalnem in neonatalnem obdobju vpliva na delitev sertolijevih celic pri laboratorijskih glodalcih. Zmanjšana dejavnost ščitnice je vplivala na podaljšanje časa delitve sertolijevih celic in podaljšanje izražanja genov, kot sta antimüllerjev hormon (AMH) in receptor za ščitnične hormone c-erbA.

V prvem delu raziskave je bil naš namen spremljanje razvoja mod prašičev po rojstvu, brez posebnega vplivanja na delovanje ščitnice. V raziskavo so bili vključeni prašiči švedske deželne pasme, ki smo jih kastrirali takoj po rojstvu in pri starostih 1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16 in 20 tednov, v podskupinah po pet prašičev. Razvoj mod smo spremljali histološko, prisotnost AMH, 3 $\beta$ -hidroksisteroidne dehidrogenaze (3 $\beta$ -HSD) in PCNA (proliferating cell nuclear antigen) pa smo ugotavljali z imunohistokemično metodo. V drugem delu raziskave smo 3-tedenskim pujskom ob odstavitvi v pitni vodi dodajali 0,1 % propyl thyouracil (PTU). Poskus smo opravili na prašičih švedske deželne pasme, ki smo jih kastrirali pri starostih 6, 7, 8, 9, 10, 12 in 20 tednov, v podskupinah po pet prašičev. Delovanje ščitnice smo spremljali z meritvami trijodtironina (T<sub>3</sub>) in tiroksina (T<sub>4</sub>) v krvni plazmi. Vpliv ščitničnih hormonov na razvoj mod smo kvantitativno ugotavljali z meritvami prostornine in teže mod po kastraciji ter meritvami premera semenskih cevok. Imunohistokemično pa smo ugotavljali prisotnost AMH, PCNA in 3 $\beta$ -HSD v celicah mod.

Rezultati prvega dela raziskave so pokazali, da se opaznejša dogajanja v modih začnejo po 12. tednu starosti. Pri 14. tednu smo namreč prvič opazili svetlino v posameznih semenskih cevkah ter primarne spermatocite. S prikazom PCNA smo ugotovili, da se med 12. in 14. tednom sertolijeve celice prenehajo deliti. V istem obdobju pa nismo več ugotovili prisotnosti AMH v njih. Prisotnost steroidogenega encima 3 $\beta$ -HSD smo v leydigovih celicah ugotovili pri vseh starostih. V drugem delu raziskave so rezultati meritev T<sub>3</sub> in T<sub>4</sub> pokazali statistično značilno znižanje ravni hormonov pri poskusnih živalih. Prostornina in teža mod sta bili ves čas pri poskusni skupini nižji v primerjavi s kontrolno, z netretiranimi živalmi, pri 20-tedenskih prašičih pa sta bili večji. Vendar pa razlike niso bile statistično značilne. Prav tako nismo ugotovili razlik v trajanju delitve sertolijevih celic in prisotnosti AMH v njih.

*Delo je bilo opravljeno na Kliniki za reprodukcijo domačih živali Veterinarske fakultete v Ljubljani.*

*Datum javnega zagovora: 29. marec 2000.*

*Mentor: doc. dr. Marjan Kosec, somentor: dr. Gregor Majdič.*

#### **Matjaž Uršič:** IZRAŽANJE DOPAMINSKIH RECEPTORJEV D2 V MOŽGANIH PODGAN MED SPOLNIM CIKLUSOM

S kvantitativno hibridizacijo in situ smo ugotavljali spremembe v izražanju mRNA za dopaminske receptorje D2 v možganih podganjih samic v različnih stopnjah spolnega ciklusa. Raziskali smo področje repatega jedra (*nucleus caudatus*) in lupinskega jedra (putamen) pri podganah v diestrusu 1, diestrusu 2, proestrusu in estrusu. Stopnje spolnega ciklusa smo dnevno ugotavljali z mikroskopskim pregledom citološke slike vaginalnih brisov. Sondo RNA, označeno z [35S], smo prepisali po vzorcu 1,5 kb dolgega klona cDNA za dopaminski receptor D2A. Kriostatske rezine možganov podgan smo hibridizirali, jih izprali pri pogojih visoke striktnosti in jih prekrili z avtoradiografsko emulzijo. Po 14-dnevni ekspoziciji smo emulzijo razvili in rezine pobarvali. Visoko izraženost dopaminskih receptorjev D2 smo ugotovili v področju črtastega telesa (*corpus striatum*). Ovrednotili smo stransko in osrednje področje striatuma. Z mikroskopsko preiskavo smo s pomočjo računalniško podprtega sistema za analizo slike v temnem vidnem polju prešteli srebrna zrnca specifične hibridizacije in izmerili delež površine srebrnih zrnec v vidnem polju. Na istem mestu smo nato v rezini prešteli še število celic, ki so izražale mRNA za dopaminski receptor D2.

Količina D2 receptorske mRNA v celici narašča med diestrusom 1 in doseže najvišje vrednosti v diestrusu 2, nato pa med proestrusom ponovno pada in v estrusu doseže najnižje vrednosti. Največje število celic, ki izražajo receptorsko mRNA, smo ugotovili v estrusu, najmanjše pa v diestrusu 2. Izražanje mRNA za dopaminski receptor D2 na celico je med spolnim ciklusom različno, hkrati pa se spreminja tudi število celic, ki izražajo mRNA.

Razlike v koncentraciji mRNA za dopaminski receptor D2 v striatumu so odvisne od količine mRNA, ki se izraža v celicah med stopnjami spolnega ciklusa, obenem pa tudi od števila celic, ki so med posameznimi stopnjami dejavne pri izražanju receptorske mRNA. Rezultati kažejo, da v striatumu med fiziološkimi stopnjami spolnega ciklusa prihaja do razlik v stopnji izražanja gena za dopaminski receptor D2.

*Delo je bilo opravljeno na Inštitutu za anatomijo, histologijo in embriologijo Veterinarske fakultete v Ljubljani.*

*Datum javnega zagovora: 9. junij 2000.*

*Mentor: prof. dr. Srdan V. Bavdek, somentorica: dr. Jelka Zabavnik Piano.*

**Boštjan Gašperlin: VPLIV ANIONOV IN KATIONOV V KRMNEM OBROKU NA POJAV POPORODNE PAREZE MOLZNIC**

Na treh farmah, kjer redijo skupno 736 krav molznic črno-bele pasme, smo izbrali 40 krav, ki so v preteklih laktacijah že obbolele za poporodno parezo. Krave so bile stare v povprečju 8 let in so v laktaciji pred začetkom poskusa dale v povprečju 7773 kg mleka s 4,00 % maščobe in 3,14 % beljakovin. Za poskus smo jih izbrali 6 tednov pred predvidenim porodom in v presušenem obdobju krmili z obrokom, ki je bil sestavljen iz sena ter travne in koruzne silaže. Po potrebi smo v obrok vključili tudi koruzo in ječmen. Krave niso dobivale mineralno-vitaminskega dodatka. Poskus je na treh farmah trajal dve sezoni, tako da smo spremljali dogajanja pri 6 različnih obrokih. Vsi obroki so vsebovali kalcij, fosfor, natrij in kalij v okviru normativov za krmiljenje presušenih krav. 25 kravam (anionska skupina) smo vsak dan v šestih tednih pred porodom peroralno (z zalivanjem) dajali 100 g amonijevega klorida in 100 g amonijevega sulfata. 15 krav (kationska skupina) smo obravnavali kot kontrolno skupino. Za vse obroke smo na podlagi analiz krme in obrokov izračunali kationsko-anionsko razliko obroka (DCAD) po dveh formulah. Ob dodatku klora (Cl) in žvepla (S) se je povprečni DCAD zmanjšal od +266,27 mEq/kg na -17,85 mEq/kg oziroma od +158,28 mEq/kg na -125,84 mEq/kg suhe snovi obroka. Skupno je za poporodno parezo obbolelo pet krav, tri (12,5 %) v anionski in dve (13,3 %) v kationski skupini. Ob krmiljenju v presušenem obdobju s krmo, ki je vsebovala rudninske snovi po normativih za presušene krave ter brez dodatka mikroelementov in vitaminov, smo Cl in S uporabili kot dodatek za preprečevanje poporodne pareze. Dodatek klora in žvepla na pojav poporodne pareze ni deloval preventivno. Z analizami vzorcev krvi in urina (skupno smo v obdobju pred porodom in v treh dneh po njem pri vsaki kravi opravili 15 vzorčenj) smo dokazali, da dodatek anionov statistično značilno spreminja naslednje parametre: zvišuje število eritrocitov ( $P = 0,00001$ ), Hb ( $P = 0,0164$ ), Ca ( $P = 0,00001$ ), Mg ( $P = 0,0004$ ), Na ( $P = 0,00001$ ), pH krvi ( $P = 0,0104$ ),  $\text{HCO}_3$  ( $P = 0,0271$ ) in BE ( $P = 0,0102$ ) ter znižuje aP ( $P = 0,0356$ ), AST ( $P = 0,0091$ ), celotne beljakovine ( $P = 0,0490$ ), MCV ( $P = 0,0018$ ) in pH urina ( $P = 0,00001$ ). Rezultati hematoloških parametrov (E, MCV, Hb, Ht, L) se med posameznimi fazami odvzemov (od -12 do 3) niso statistično razlikovali ( $P > 0,05$ ) ne v kationski ne v anionski skupini. Tudi pH krvi se po posameznih fazah odvzemov v kationski in anionski skupini ni statistično značilno razlikoval. Statistično značilno so se razlikovale vrednosti Ca, Na, K, Cl, celotni bilirubin, glukoza, AP, celotne beljakovine ter saturacija v obeh skupinah, aP v anionski skupini in AST v kationski skupini. V urinu se pH med posameznimi fazami odvzemov vzorcev ni razlikoval pomembno v kationski skupini, med tem ko sta se pH in specifična teža urina v anionski skupini statistično značilno razlikovali ( $P = 0,00001$ ).

*Delo je bilo opravljeno na Kliniki za prežvekovalce Veterinarske fakultete v Ljubljani.*

*Datum javnega zagovora: 9. junij 2000.*

*Mentor: prof. dr. Ivan Jazbec, somentor: doc. dr. Tomaž Zadnik.*

**Vesna Cerkvnik:** OSTANKI IVERMEKTINA V OVČJI PLAZMI IN MLEKU TER VPLIV TOPLOTNE OBDELAVE IN MLEČNOKISLINSKE FERMENTACIJE NA NJIHOVO VSEBNOST V MLEČNIH IZDELKIH

Raziskali smo izločanje ostankov ivermektina (IVM) v ovčji plazmi in mleku 6 ovc mlečne pasme (istrska pramenka) po enkratnem podkožnem vnosu 0,2 mgIVM/kg t.m. Med živalmi je bila precejšnja koncentracijska individualna variabilnost v obeh matriksih. Najvišja koncentracija v plazmi je bila 21,7  $\mu\text{gH}_2\text{B}_{1a}/\text{l}$ , v mleku pa 44,9  $\mu\text{gH}_2\text{B}_{1a}/\text{kg}$ , ugotovili pa smo ju drugega oz. prvega dne poskusa pri isti živali. Pri eni ovci je koncentracija ivermektina v mleku padla pod mejo zaznavnosti analitske metode 14. dan, pri treh ovcah 17. dan, pri dveh živalih pa smo ostanke ( $< 1$  ppb) ugotovili še po 35 dneh po vnosu zdravila. Peroralni posredni vnos ivermektina z mlekom v sesna jagnjeta je bil majhen in zaradi tega po naši sodbi zanemarljiv glede higiene užitnih tkiv. Najvišja koncentracija v plazmi (0,36  $\mu\text{gH}_2\text{B}_{1a}/\text{l}$ ) je komaj presegla mejo vrednotenja metode. Povprečno razmerje med koncentracijo ivermektina v mleku in plazmi je bilo za prvih sedem dni 1,67. Z mlekom se je povprečno izločilo 0,7 % odmerka. Farmakokinetično analizo smo izvedli z uporabo neprostorske analize in s prilagajanjem enoprostornega modela\*. Povprečja za  $t_{\text{max}}$ ,  $c_{\text{max}}$ ,  $t_{1/2\text{ke}}$  in AUC so bila naslednja za plazmo: 2,17 oz. 1,70\* dni, 11,64 oz. 11,88\*  $\mu\text{g}/\text{l}$ , 3,11 oz. 2,85\* dni in 63,5 oz. 64,0\*  $\mu\text{gdan}/\text{l}$  in naslednja za mleko: 2,5 oz. 1,28\* dni, 21,11 oz. 22,67\*  $\mu\text{g}/\text{l}$ , 3,04 oz. 3,56\* dni in 106,8 oz. 114,6\*  $\mu\text{gdan}/\text{l}$ . Povprečno plazemsko AUC razmerje jagnje : ovca je bilo v prvih 5 dneh 0,02.

Toplotna obdelava ovčjega mleka pod pogoji pasterizacije in visoke pasterizacije ter vretja na vsebnost ivermektina ni vplivala ne glede na višino koncentracije in način vnosa ivermektina (*in vitro*, *in vivo*). Vpliv mlečnokislinske fermentacije smo proučili s predelavo skupnih dnevnih vzorcev mleka (33 dni po podkožnem vnosu 0,2 mgIVM/kg t.m.) 30 ovc v naslednje mlečne izdelke: jogurt iz surovega in toplotno obdelanega mleka, sveži sir, sir, zorjen 30 dni, sir, zorjen 60 dni, primarno in sekundarno sirotka ter albuminsko skuto. Najvišje vsebnosti ostankov v mlečnih izdelkih smo ugotovili pretežno 2. dan po vnosu zdravila v ovce. Najvišje koncentracije ostankov so bile v siru, zorjenem 60 dni, 2. dan poskusa, in sicer kar 96  $\mu\text{gH}_2\text{B}_{1a}/\text{kg}$ . Matriks z najnižjo vsebnostjo ostankov je bila sekundarna sirotka, kjer koncentracije niso presegle 0,6  $\mu\text{gH}_2\text{B}_{1a}/\text{kg}$ . Vsebnost ostankov je padla pod mejo zaznavnosti analitske metode v času od 5. dne (sekundarna sirotka) do 25. dne (siri, albuminska skuta) po vnosu zdravila. Ugotovili smo linearno povezavo med dnevno koncentracijo ostankov ivermektina v teh matriksih z vsebnostjo mlečne maščobe oz. suhe snovi. Časovne koncentracijske krivulje za obe vrsti jogurta in izhodiščno mleko so se dobro prekrivale, kar je bil znak dobre fermentacijske in potrditve toplotne obstojnosti ostankov ivermektina. Med izdelavo sirarskih izdelkov se je približno 35 % ostankov ivermektina (glede na izhodiščno mleko) izgubilo. Predelava ivermektina v sirarske izdelke kljub temu ni rešitev v primeru dajanja tega zdravila med laktacijo, ker njegovi ostanki pretežno ostanejo. Ugotovili smo dobro enoletno zamrzovalno obstojnost ( $-20$  °C) ostankov ivermektina v ovčjem mleku in mlečnih izdelkih, po dvoletnem zamrzovanju pa so se tovrstni ostanki v mleku zmanjšali približno za četrtno. Plazmo, mleko in mlečne izdelke smo analizirali na vsebnost  $\text{H}_2\text{B}_{1a}$  s HPLC metodo s fluorescenčno detekcijo. Vzorce smo pred meritvami ekstrahirali z acetonitrilom, jih čistili s SPE s  $\text{C}_8$  ekstrakcijskimi kolonicami, koncentrirali pod  $\text{N}_2$  in jih predkolonsko derivatizirali s TFAA in NMIM. Dosegli smo dobro selektivnost, linearnost tako na širšem območju kot na območju meje vrednotenja ( $r \geq 0,9951$ ). Povprečni izkoristek metode glede na vrsto matriksa je bil med 89 in 101 %, s KV pod 15 %. Meje zaznavnosti so bile med 0,08  $\mu\text{gH}_2\text{B}_{1a}/\text{kg}$  (siri, albuminska skuta) in 0,15  $\mu\text{gH}_2\text{B}_{1a}/\text{kg}$  (mleko), meje vrednotenja pa so bile približno enkrat višje.

*Delo je bilo opravljeno na Inštitutu za higieno živil in bromatologijo Veterinarske fakultete v Ljubljani.*

*Datum javnega zagovora: 22. junij 2000.*

*Mentor: prof. dr. Valentin Skubic, somentorica: doc. dr. Darinka Zdenka Doganoc.*

**Teodora Ivanuš:** MAKROMOLEKULARNA KONTRASTNA SREDSTVA PRI SLIKANJU Z MAGNETNO REZONANCO IN MERJENJE PRETOKA KRVI V SA-1 TUMORJIH MIŠI

Slikanje z magnetno resonanco (MR) je diagnostična metoda, ki omogoča predvsem razločevanje mehkih tkiv. Razločevanje lahko dodatno povečamo z uporabo kontrastnih sredstev: nizkomolekularnih kontrastnih sredstev, kamor sodi klinično uveljavljen Gd-DTPA (gadolinij (IH) dietilen-triaminopentaocetna kislina) in makromolekularnih kontrastnih sredstev. Slednja se uporabljajo predvsem za določevanje integritete žilja in so še vedno v predklinični fazi testiranja.

Uporabili smo dve novi makromolekularni kontrastni sredstvi gadomer-17 in polilizin-Gd-DTPA ter kontrastno sredstvo Gd-DTPA. Z njuno uporabo smo želeli natančneje opisati kvaliteto tumorskega žilja tako, da smo določali prekrvljenost tumorskega tkiva (BV) in permeabilnost tumorskega žilja (PS) pri neobdelanih tumorjih in tumorjih, zdravljenih z vinblastinom, ali tumorjih, katerim smo aplicirali električne pulze visoke napetosti. Pokazali smo, da oba makromolekularna kontrasta omogočata bistveno natančnejšo oceno tumorskega žilja, to je njegovo permeabilnost in prekrvljenost tumorja v primerjavi z Gd-DTPA. S tehniko dinamičnega kontrastno poudarjenega MR-slikanja smo pokazali tudi učinke obeh terapij z zmanjšanjem vrednosti BV in PS. Električni pulzi so bili učinkovitejši od vinblastina. Izmed treh uporabljenih kontrastnih sredstev pa je bil gadomer-17 najprimernejši in najbliže potencialni klinični uporabi.

Rezultati raziskave so nova spoznanja o uporabi novih makromolekularnih kontrastnih sredstev za ocenjevanje prekrvljenosti tumorjev kot tudi spoznanja o delovanju vinblastina in aplikacije električnih pulzov na žilje tumorja.

*Delo je bilo opravljeno v Laboratoriju za slikanje z magnetno resonanco Odseka za fiziko trdne snovi na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani in na Oddelku za tumorsko biologijo Onkološkega inštituta v Ljubljani.*

*Datum javnega zagovora: 6. november 2000.*

*Mentor: prof. dr. Vladimir Jevtič, somentor: prof. dr. Gregor Serša.*

**Alenka Seliškar:** HEMODINAMSKI, PRESNOVNI IN ENDOKRINI ODZIV NA ZDRAVLJENJE HEMORAGIČNEGA ŠOKA S HIPERTONIČNIMI RAZTOPINAMI PRI PSIH

Namen raziskave je bil primerjati hemodinamski, presnovni in endokrini odziv na zdravljenje hemoragičnega šoka z majhnim odmerkom 7,5% raztopine NaCl in krvjo z večjim odmerkom sestavljenega natrijevega laktata in krvjo ter ugotoviti uporabnost kapnometrije pri vrednotenju uspešnosti zdravljenja hemoragičnega šoka.

Raziskavo smo opravili na šestih psih pasme beagle v splošni anesteziji z vodenim predihavanjem.

Ugotovili smo, da je zdravljenje s 7,5% raztopino NaCl tehnično preprostejše in varnejše kot zdravljenje s sestavljenim natrijevim laktatom, saj smo s 7,5% raztopino NaCl dosegli ugodnejši hemodinamski odziv ob hkrati dobrem razmerju med ponudbo in porabo kisika. Zdravljenje hemoragičnega šoka s 7,5% raztopino NaCl je ohranilo ledvično funkcijo in preprečilo nastanek akutne odpovedi ledvic, presnovni in endokrini odzivi na zdravljenje pa so bili podobni kot pri uporabi sestavljenega natrijevega laktata.

Dobra skladnost med indeksom minutnega volumna srca in vrednostmi  $ETCO_2$  je potrdila zanesljivost kapnometrije pri vrednotenju sprememb indeksa minutnega volumna srca.

Zaradi ugodnih hemodinamskih učinkov priporočamo zdravljenje hemoragičnega šoka s 7,5% raztopino NaCl predvsem pri pacientih z boleznimi srca in žilja, pri katerih lahko večji odmerki izotoničnih raztopin povzročijo preobremenitev srčno-žilnega sistema.

*Delo je bilo opravljeno na Kliniki za kirurgijo in male živali Veterinarske fakultete v Ljubljani.*

*Datum javnega zagovora: 27. november 2000.*

*Mentor: prof. dr. Janoš Butinar, somentor: doc. dr. Mirta Koželj.*

**Metka Pislak:** UPORABNOST METOD MOLEKULARNE BIOLOGIJE ZA DIAGNOSTIKO PARATUBERKULOZE PRI DROBNICI

V našem raziskovalnem delu smo uvedli metodo PCR (polymerase chain reaction) za neposredno ugotavljanje *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (IS900 - insercijska sekvenca) v fecesu in v tkivih drobnice za uporabo v diagnostične namene. Postopek PCR smo izvedli na 92 vzorcih fecesa in 30 vzorcih svežih tkiv serološko pozitivnih ovac in koz in na 58 arhivskih vzorcih tkiv, ki smo jih dobili v patohistološko preiskavo na paratuberkulozo. Rezultate metode PCR smo primerjali z rezultati mikroskopske oziroma patohistološke preiskave in gojiščne preiskave. Primerjali smo tudi štiri postopke izolacije DNA za PCR in štiri metode ugotavljanja značilnosti produktov PCR, Primerjavo občutljivosti gojiščne preiskave, metode PCR z dvema različnima postopkoma izolacije DNA in metode PCR ELISA smo izvedli na 100 vzorcih fecesa negativnih živali z dodanimi suspenzijami *M. avium* subsp. *paratuberculosis* v znanih koncentracijah. V okviru te raziskave smo oblikovali postopek analize RFLP

(določanje polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov - restriction fragment length polymorphism) za ugotavljanje genetske variabilnosti sevov vrste *M. avium* subsp. *paratuberculosis*.

Ugotovili smo, da uporaba metod molekularne biologije omogoča hitrejšo, bolj občutljivo in specifično diagnostiko paratuberkuloze neposredno na vzorcih fecesa in tkiv drobnice. Med vsemi metodami, testiranimi v tej raziskavi, je bila najobčutljivejša metoda PCR ELISA s sondo DNA 'ELISA 900', ki smo jo sami oblikovali in je v tem prispevku prvič opisana. Za izolacijo DNA iz vzorcev fecesa in tkiv za metodo PCR je najučinkovitejša uporaba kompleta za izolacijo DNA (Boehringer) s predhodno obdelavo vzorcev s HPC (heksadecilpiridinium klorid). Metoda PCR za ugotavljanje paratuberkuloze pri drobnici je bila na vzorcih fecesa ovac in koz občutljivejša od gojiščne preiskave, na vzorcih svežih tkiv pa od patohistološke in gojiščne preiskave. Na arhivskih vzorcih tkiv je bila metoda PCR občutljivejša od patohistološke preiskave. Z analizo RFLP 5 sevov vrste *M. avium* subsp. *paratuberculosis* smo ugotovili dva različna genotipa.

*Delo je bilo opravljeno na Inštitutu za patologijo, sodno in upravno veterinarstvo, Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo ter Inštitutu za anatomijo, histologijo in embriologijo Veterinarske fakultete v Ljubljani.*

*Datum javnega zagovora:* 6. december 2000.

*Mentor:* prof. dr. Milan Pogačnik, *somentorica:* dr. Jelka Zabavnik Piano.