



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

Trakealkollaps hos shetlandsponnyer - korrelation med inflammation i trakealslemhinnan

Camilla Karlsson

Uppsala

2010

Examensarbete inom veterinärprogrammet

*ISSN1652-8697
Examensarbete 2011:10*

Trakealkollaps hos shetlandsponnyer - korrelation med inflammation i trakealslemhinnan

Camilla Karlsson

Handledare: Miia Riihimäki, Institutionen för kliniska vetenskaper

Examinator: Bernt Jones, Institutionen för kliniska vetenskaper

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2010
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper
Kurskod: EX 0239, Nivå AXX, 30 hp*

Nyckelord: häst, trakealkollaps, inflammation, trakealinspirat, BAL

*Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>
ISSN1652-8697
Examensarbete 2011:10*

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning.....	3
Syfte.....	3
Bakgrund	3
Etiologi.....	3
Symptombild	4
Diagnos.....	4
Behandling.....	5
Material och metoder	5
Hästar	5
Klinisk undersökning.....	6
Endoskopiundersökning av luftvägar	6
Provtagning och analys.....	7
<i>Trakealaspirat</i>	7
<i>Bronkoalveolärt lavage, BAL</i>	8
Statistik.....	8
Resultat.....	8
Hästar	8
Klinisk undersökning.....	9
Endoskopi	9
Trakealaspirat.....	10
<i>Bakteriologi</i>	10
<i>Cytologi</i>	11
Bronkoalveolärt lavage, BAL.....	12
Diskussion.....	12
Tack till.....	15
Referenslista.....	16

SAMMANFATTNING

Trakealkollaps betraktas som ett ovanligt tillstånd hos häst. Ett mindre antal fallrapporter och studier indikerar dock att det skulle vara något mer förekommande hos miniatyraser och ponnyer. Syftet med denna studie var att studera om det hos Shetlandspannyer med trakealkollaps kunde ses ett samband mellan trakealkollaps och inflammation i trakealslemhinnan. I studien ingick 29 Shetlandspannyer. Dessa genomgick en allmän klinisk undersökning, speciell undersökning av respirationsorganen och endoskopiundersökning av luftvägarna. Vid endoskopiundersökningen bedömdes hela trakea för förekomst av trakealkollaps och vid eventuell kollaps bedömdes dess längd och läge i trakea, samt graderades enligt en skala från I-IV. Vid endoskopiundersökningen bedömdes även parametrar som indikerar inflammation i trakealslemhinnan, så som förekomst av mucus, hyperemi, ödem och utseende hos trakeas septum. Via endoskopet togs trakealinspirat för bakterieodling och cytologi. Hos ponnyer med trakealkollaps av grad II och III, samt slumpmässigt utvalda friska ponnyer, gjordes även BAL. Enligt endoskopiundersökningen klassificerades sex stycken ponnyer som sjuka, dessa hade trakealkollaps av grad II-III. Resterande 23 ponnyer klassificerades som friska, i denna grupp ingick de med helt normal form på trakea, tretton ponnyer, och tio ponnyer med kollaps av grad I. En statistiskt signifikant åldersskillnad kunde ses mellan grupperna, där medianåldern hos ponnyerna i den sjuka gruppen, femton år, var väsentligt högre än hos ponnyerna i den friska gruppen, fem år. Hyperemi och ödem i trakealslemhinnan och i larynx, som indikerar inflammation, var vanligare förekommande hos de sjuka ponnyerna. Övriga visuellt bedömda parametrar vid endoskopiundersökning av luftvägarna visade ingen signifikant skillnad mellan grupperna. Cytologi på trakealinspirat och BAL visade ingen skillnad mellan grupperna. Vid bakteriologisk odling på trakealinspirat fanns växt av i huvudsak normalflora hos största delen av hästarna. Bakterieväxt kunde ses hos samtliga i den sjuka gruppen, men skillnaden mellan grupperna var inte tydlig nog då materialet är så litet. Endast en ponny, som ingick i den friska gruppen, visade tecken på bakteriell infektion i trakea. Vissa parametrar som använts i studien tyder på att samband finns mellan trakealkollaps och inflammation i trakealslemhinnan hos Shetlandspannyer, men ytterligare studier med ett större material behövs för att säkerställa om det finns statistisk signifikans.

SUMMARY

Tracheal collapse is not considered a common disorder in horses. A small number of case reports and studies indicate that it may be somewhat more common in miniature horses and ponies. The aim of this study was to examine whether there is a correlation of tracheal collapse to inflammation of the tracheal mucosa. In total 29 Shetland ponies were included in the study. They all had a clinical examination, a detailed respiratory examination and an endoscopic examination of the airways to the tracheal bifurcation. The entire length of the trachea was examined for tracheal collapse. When a collapse was found its length was measured and its location was recorded. The severity of collapse was graded from I – IV according to a previously published scoring system. During the endoscopic examination parameters indicative of tracheal mucosal inflammation such as existence of mucus, hyperemia, edema and tracheal septum thickness were recorded. Tracheal aspirates were obtained for bacterial and cytologic examination. In five ponies with a tracheal collapse more severe than grade I and in four randomly selected healthy ponies broncho-alveolar-lavage was performed. Six ponies had a tracheal collapse of grade II or III. The other 23 ponies, both with a normal tracheal shape (n=13) and ponies with a tracheal collapse of grade I (n=10) were classified as healthy. The median age, 15 years, of the group with tracheal collapse of grade II or III was significantly higher ($p=0,0006$) than the median age, 5 years, of the healthy group. Only selected parameters indicative of tracheal inflammation, including hyperemia and edema of tracheal mucosa and larynx, were more commonly recorded in the group with tracheal collapse than in the healthy group, whereas other visually assessed parameters did not differ between the groups. The cytology of the tracheal aspirates or, where taken, BAL showed no difference between the two groups. Bacterial growth, essentially normal flora, was recovered from the tracheal aspirate from most ponies, with only six of the ponies, in the healthy group, being bacterial culture negative. Only one pony, that was included in the healthy group, showed signs of bacterial infection in the trachea. The results of this study suggest there is a correlation of tracheal collapse and inflammation of the tracheal mucosa in Shetland ponies, but further studies with a larger number of horses is required to confirm these findings.

INLEDNING

Trakealkollaps anses vara ett ovanligt tillstånd hos häst, speciellt utan ett föregående trauma (Mair och Lane, 1990; Tetens et al, 2000; Couëtil et al, 2004). Det finns endast ett mindre antal fallrapporter rörande problemet, som främst behandlar olika behandlingsmetoder. Hos hund däremot är det ett relativt vanligt förekommande problem, framför allt hos vissa småväxta raser och miniatyrraser (White och Williams, 1994; Johnson och Fales, 2001). De fallrapporter som finns hos häst ger en bild av att tillståndet kan förekomma hos hästar i alla åldrar och av alla raser, men att det skulle vara mer frekvent förekommande hos miniatyrraser och små ponnyer och även hos åsnor (Aleman et al, 2008; Powell et al, 2009). Vid en amerikansk studie av trakealkollaps hos amerikanska miniatyrhästar var prevalensen av trakealkollaps i den undersökta gruppen nära 6 % (Aleman et al, 2008). En studie av Powell et al från 2009, där trakea från en grupp åsnor av hög ålder undersöktes efter avlivning, visade att 16 % av åsnorna hade trakealkollaps, men knappt hälften av dem hade uppvisat kliniska symptom från respirationsvägarna. Detta indikerar att ett större antal individer än vad som tidigare trots kan ha åkomman och att subkliniska fall förekommer.

SYFTE

Syftet med denna studie var att undersöka om det hos Shetlandspionnyer med trakealkollaps kunde ses ett samband mellan trakealkollaps och inflammation i trakealslemhinnan. Detta gjordes genom att studera flera olika parametrar som kan indikera att inflammation pågår i trakea.

BAKGRUND

Etiologi

Vid trakealkollaps blir trakeas lumen mindre än normalt. Trakea kollapsar vanligtvis dorsoventralt hos hästar (Dixon et al, 2007; Aleman et al, 2008). Lateral kollaps har rapporterats i ytterst enstaka fall och då främst i samband med kollaps till följd av ett föregående trauma (Dixon et al, 2007). Detsamma gäller för hundar, där lateral kollaps är ovanligt och tros främst orsakas av traumatiska skador (Buback et al, 1996). Vid trakealkollaps kan hela trakea vara påverkad eller enbart ett eller flera segment av olika längd. Beroende av vilken del av trakea som är påverkad kommer problemen främst att uppstå vid antingen inspiration eller expiration. Vid kollaps i trakeas cervikala del blir lumen som smalast vid inspiration, då inandningen skapar ett negativt tryck i trakea, medan det vid kollaps i den intratorakala delen blir maximal avsmalning vid expiration på grund av det höga trycket i thorax vid utandning (Couëtil et al 2004, Aleman et al 2008). Trakealkollaps kan uppkomma av flera olika orsaker och kombinationer av dessa. Trakeas broskringar kan vara missformade och istället för den normalt runda formen har de ett tillplattat utseende, vilket ger en minskning av storleken på luftstrupens lumen i det dorsoventrala planet. Tillsammans med detta blir trakeas dorsala ligament bredare och slappare vilket gör att det faller ned i lumen och ytterligare förminskar detta (Mair and Lane, 1990). Trakeas broskringar kan även vara missformade så att ändarna på broskringarna inte överlappar varandra som normalt, utan istället slutar i mer eller mindre dorsal riktning. I samband med detta får det dorsala ligamentet sin infästning på ringarna belägen mer ventralt och trakeas lumen blir på så sätt mindre (Dixon et al, 2007). Det förekommer även att trakeas broskringar har en relativt normal form, men att det dorsala ligamentet av okänd orsak är separerat från den dorsala delen av broskringarna. Ligamentet får då en mer ventral position än vad som är normalt och trakeas lumen blir smalare (Dixon et al, 2007). Orsaken till att broskringarna blir missformade

är inte helt klarlagd. I en studie av Aleman et al, 2008, där histopatologisk undersökning utfördes av trakea från fyra medelålders amerikanska miniatyrhästar med trakealkollaps såg man förändringar i broskringarna som tydde på en degenerativ process. En annan studie av Simmons et al, 1988, där broskringar från ett föl av miniatyras med trakealkollaps undersöktes påvisade förändringar i brosket som tydde på en chondrodysplastisk process. Trakealkollaps kan även orsakas av lidanden som ger dyspné och därmed ett ökat inspiratoriskt tryck och turbulens i trakea. Detta orsakar inflammation i slemhinnan med svullnad och ödem som följd och detta minskar trakeas lumen, vilket ytterligare ökar trycket i trakea. Detta har rapporterats bland annat i samband med lunginflammation hos häst (Fenger och Kohn, 1992).

Hos hundar med trakealkollaps har man sett att när hunden väl fått symptom av sin kollaps uppstår ett kroniskt inflammationstillstånd i trakealslemhinnan. Den onormala formen på trakea och det slappa, förlängda dorsala ligamentet gör att slemhinnan i dorsala och ventrala trakea kommer i kontakt med varandra och mekanisk retning uppstår. Det blir en ond cirkel där inflammationen förvärrar tillståndet genom att trakeas lumen blir ännu trängre, och detta orsakar ännu mer irritation, som ytterligare ökar inflammationen (White och Williams, 1994). Inflammationen leder till ökad produktion av mucus som en följd av att det uppstår hyperplasi av subepiteliala körtlar i trakealslemhinnan. Den leder även till epitelförluster och att fibrinösa membran bildas (Dallman et al, 1988). De förändringar som sker i slemhinnan vid den kroniska inflammationen gör att funktionen hos cilierna i trakea försämras och transporten av mucus blir mindre effektiv. Detta kommer att förorsaka ytterligare retning av slemhinnan och leda till mer inflammation (Powell et al, 2009).

Hos människa har man sett att trakeomalacia ofta ger upphov till återkommande bakteriella infektioner i nedre luftvägarna (Boogaard et al, 2005). En studie på hundar med trakealkollaps av Johnson och Fales, 2001, indikerade att bakterier kan isoleras oftare från trakealinspirat hos hundar med trakealkollaps än från friska hundar. De bakterier som isolerades från dessa hundar skiljde sig också något från normalfloran som sågs hos de friska hundarna. Man kunde dock inte vid cytologisk kontroll konfirmera att det rörde sig om bakteriell infektion och inte enbart förekomst av bakterier.

Symptombild

De kliniska tecknen på trakealkollaps hos häst kan variera mellan individer. Arbetsintolerans, respiratoriska missljud, hosta som ibland beskrivs ha ett speciellt skällande ljud, tachypné, dyspné, problem att äta, samt allvarligare symptom så som letargi, anorexi, kollaps och dödsfall har rapporterats (Aleman et al, 2008). Ofta beskrivs problemen som att först ha uppträtt intermittent och främst i samband med arbete, stress och vid intag av föda, samt vid vistelse i dammiga miljöer. Det har även beskrivits att ston uppvisar mer kliniska tecken under dräktighet (Aleman et al, 2008). Trakealkollaps har ett progredierande förlopp och symptomen tenderar att bli kraftigare och kvarstå under allt längre tid för varje gång hästen går in i period med uppvisande av symptom (Aleman et al, 2008). Symptomen förvärras ofta vid varmt och fuktigt väder och många hästar blir därför sämre under sommaren för att sedan åter bli något bättre när hösten kommer (Dixon et al, 2007).

Diagnos

Endoskopisk undersökning av trakea betraktas som den mest fördelaktiga metoden att diagnostisera trakealkollaps hos häst (Graham et al, 2010). Det är även den metod som är gold standard för att diagnostisera tillståndet hos människa, där det kallas trakeomalacia (Carden et al, 2005). En människa bedöms lida av trakeomalacia när trakeas diameter är avsmalnad till

50 % eller mer (Carden et al, 2005). Med hjälp av endoskopi är det möjligt att dels utesluta övre luftvägarna som orsak till respiratoriska missljud och dyspné, dels att vid undersökningen avgöra hur stor del av trakea som är påverkad, var i trakea kollapsen finns och hur kraftig kollapsen är. Genom palpation av trakea kan man ibland känna att den har onormal form. Denna undersökning är dock begränsad till den proximala delen av trakea och det är inte alltid som broskringarna och därmed trakeas yttre form, har en onormal form vid trakealkollaps (Dixon et al, 2007). Auskultation över trakea kan vara till hjälp på så sätt att eventuella respiratoriska missljud kan lokaliseras med hjälp av detta (Graham et al, 2010). Röntgen kan vara ett hjälpmedel vid diagnosställande, man kan då se ett platt utseende hos trakea med en smalare luftspalt än normalt. Risken för ett falskt normalt utseende är dock överhängande om röntgenbilder inte tas vid rätt tillfällen i respirationscykeln (White och Williams, 1994). Studier hos hundar har visat att röntgen hos dessa kan upptäcka trakealkollaps endast i upp till 60 % av fallen (Tangner och Hobson, 1982).

Behandling

Möjligheterna till behandling är begränsade. Flera fallrapporter har beskrivit olika former av kirurgiska ingrepp, som haft varierande framgång. Om ett område av endast fem eller färre broskringar är påverkat är en resektion och anastomos av trakea möjlig (Tate et al, 1981). Trakea kan stabiliseras med cirkelformade stöd för broskringarna, som placeras runt trakea på dess utsida och fästes med stygn till broskringarna för att ge dessa en mer normal form (Robertson o Spurlock, 1986; Simmons et al, 1988; Graham et al, 2010). Vid kraftigt missformade broskringar kan chondrotomi krävas i samband med placandet av stödet runt trakea, för att kunna åstadkomma en normal form (Robertson o Spurlock, 1986; Simmons et al, 1988). Ett stabiliserande stöd kan även placeras i trakeas lumen, vilket har den fördelen att ingreppet kan göras på ett mindre invasivt sätt, då ett självexpanderande stöd kan föras på plats med hjälp av en kateter över en ledare (Couëtil et al, 2004). Medicinsk behandling är möjlig. Om ett samtidigt lunglidande finns måste detta behandlas och då sådan behandling ska minska dyspnén gör det att trakealkollapsen förbättras. Ansträngning av hästen bör minimeras och påverkade hästar bör hållas i svalt inomhusklimat vid varmt väder. I fall med svårt påverkade hästar kan kortikosteroider vara indicerat för att minska den sekundära inflammation som uppstår i trakealslemhinnan (Dixon et al, 2007). Detta är en behandlingsmetod som används och fungerar väl på hundar, ibland i kombination med atropin för att även minska sekretionen av mucus (White och Williams, 1994). Inga studier på häst har kunnat hittas där dessa läkemedel utvärderats för enbart medicinsk behandling av trakealkollaps. I en studie av Mair och Lane, 1990, beskrivs behandling av ett ponnysto med trakealkollaps med butorfanol tartate intravenöst, för dess antitussiva effekt, under tre dagar, som framgångsrik. Denna behandling finns även beskriven i studier på hundar (Buback et al, 1996). Det är vanligt att hundar med trakealkollaps även behandlas med antibiotika, detta på grund av att bakterieodling från trakealinspirat ofta uppvisar positiva resultat. Studier visar dock att även cytologi bör visa tecken på bakteriell infektion för att antibiotikabehandling ska vara indicerat (Johnson och Fales, 2001). Långtidsprognosen för hästar med trakealkollaps anses som dålig, då förloppet är progressivt (Aleman et al, 2008).

MATERIAL OCH METODER

Hästar

29 privatägda Shetlandsponnyer, fördelade på åtta olika ägare, ingick i studien. Då studien inte hade för avsikt att undersöka prevalens av trakealkollaps inkluderades även ponnyer som tidigare diagnostiserats med trakealkollaps. För varje häst fylldes en blankett i av djurägaren, där frågor om uppställning, användning och eventuella luftvägssymptom besvarades. Studien

var godkänd av Centrala försöksdjursnämnden, diarienummer C113/10 Uppsala Djurförsöksetiska Nämnd.

Klinisk undersökning

En allmän klinisk undersökning och speciell undersökning av respirationsorganen utfördes på samtliga ponnyer. Vid den speciella undersökningen av respirationsorganen auskultades lungfälten och trakea i vila med hjälp av stetoskop och därefter utfördes samma auskultation vid användning av re-breathing bag.

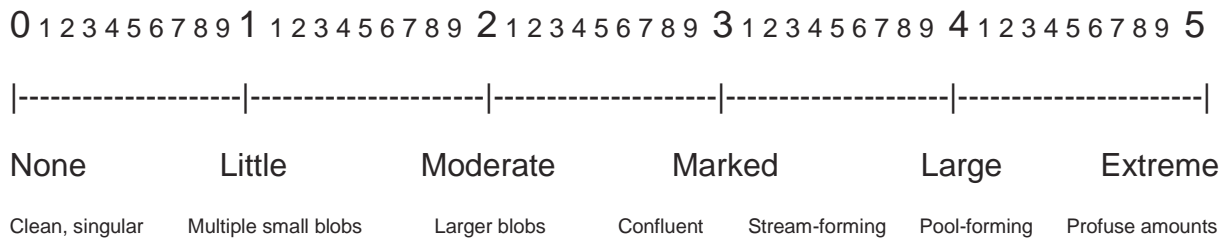
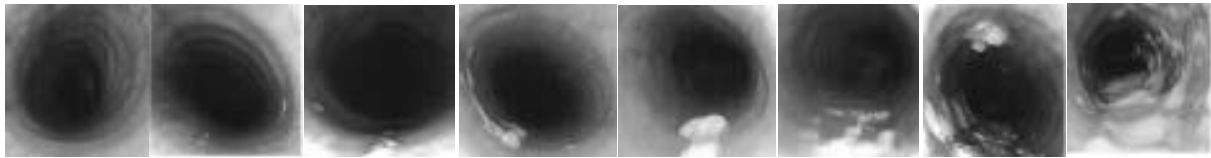
Endoskopiundersökning av luftvägar

Inför undersökning med videoendoskop sederades hästarna med romifidin, dos ca 0,015 mg/kg (Sedivet[®] vet, Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Tyskland) och vid behov i kombination med butorphanol, dos ca 0,005 mg/kg (Butador vet, Vetoquinol Scandinavia AB) intravenöst. En ponny sederades inte då endoskopiundersökningen på denna utfördes i anslutning till arbetsprov för en annan del av studien. Vid undersökningen användes även en brems på de allra flesta hästarna. Endoskop (Eickemeyer, XE30-Motion, 9,5 x 1800 mm) fördes in via valfri näsborre, genom näshålan till svalget och sedan vidare ned i trakea. I svalget undersöktes tecken på irritation, så som hyperemi i slemhinnan och ödem eller svullnad i vävnaden, samt tecken på patologisk konformation av svalget. Hela trakea utvärderades för eventuell förekomst av trakealkollaps. Trakeas form bedömdes och trakealkollaps graderades enligt en redan existerande skala för trakealkollaps av grad I-IV, som konstruerades av Tagner och Hobson i en studie på hundar med trakealkollaps 1982. Denna skala har även använts för att gradera trakealkollaps hos hästar (Aleman et al, 2008; Graham et al, 2010). Tabell 1 visar en version av graderingssystemet.

Tabell 1. Bedömning och gradering av trakealkollaps.

Gradering	Kriterier
Grad I	Trakeas lumen minskat med ca 25 %. Trakeas form i princip normal, runda broskringar. Dorsala ligamentet lindrigt prolaberande.
Grad II	Trakeas lumen minskat med ca 50 %. Något hoptryckta broskringar. Dorsala ligamentet förlängt och prolaberande.
Grad III	Trakeas lumen minskat med ca 75 %. Hoptryckta broskringar. Dorsala ligamentet förlängt och prolaberande.
Grad IV	Trakeas lumen minskat med ca 90 %. Broskringarna hoptryckta, ibland inverterade ändar. Dorsala ligamentet i princip i kontakt med trakeas ventrala mukosa.

Endoskopiundersökningarna spelades in och trakeas utseende bedömdes ytterligare en gång, via de inspelade filmerna, av en veterinär med mycket stor erfarenhet av endoskopiundersökningar. Vid endoskopiundersökningen kontrollerades även förekomst av mucus i trakea. Vid eventuell förekomst noterades lokalisering, färg och viskositet hos mucuset. Eventuell ackumulering av mucus bedömdes och graderades enligt en tidigare publicerad femgradig skala (Gerber et al, 2004).



Akkumulering av mucus i trakea

Skala enligt Gerber et al, 2004

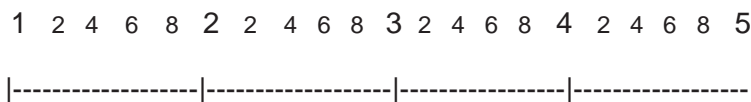
Lokalisation av mucus bedömdes som ventral, lateral eller dorsal. Viskositet hos mucus bedömdes enligt följande skala:

mycket lättflytande – lättflytande – intermediärt – visköst – mycket visköst

Färg på mucus bedömdes enligt spektrat:

gult – vitt - färglöst

I trakea bedömdes även slemhinnans utseende med avseende på hyperemi och ödem. Hela trakea bedömdes ned till bifurkationen där septum mellan huvudbronkerna bedömdes med avseende på tjocklek enligt en redan existerande tregradig skala, Septum Thickness Score (Koch et al 2007).



Septum thickness scores (STS)

Skala enligt Koch et al, 2007

Provtagning och analys

Trakealaspirat

Vid endoskopiundersökning fördes en provtagnings slang genom endoskopets arbetskanal genom vilken 20 ml steril NaCl deponerades i trakea för att sedan sugas tillbaka med hjälp av en spruta. Återvunnen mängd delades sedan i två sterila rör, vilka sedan lämnades till laboratorieanalys för bakterieodling respektive cytologisk undersökning. Prov för allmän

bakteriologisk undersökning odlades och analyserades vid bakteriologiska laboratoriet på SVA, Uppsala. Prov för cytologisk undersökning preparerades vid Klinisk kemi, UDS. För varje prov preparerades ett direktutstryk samt ett cytospinpreparat. Till cytospinpreparatet användes 200µl prov till vilket tillsattes 50µl albuminlösning. När preparaten torkat färgades de med May-Grünwald-Giemsas i ett automatiskt färgningssystem. Preparatet analyserades genom manuell bedömning av förekomst av neutrofiler, som bedömdes som enstaka celler, lindrig, måttlig eller riklig förekomst.

Bronkoalveolärt lavage, BAL

Hos vissa ponnyer utfördes efter endoskopiundersökning BAL. Fem av de sjuka ponnyerna provtogs och fyra slumpmässigt utvalda friska ponnyer. Provtagningen utfördes blint, enbart med hjälp av en särskild kuffad provtagningsslang (Veterinary Bronco-Alveolar Lavage Catheter, SurgiVet, Smiths Medical PM Inc. Veterinary Division, 10 x 2400 mm). Inför provtagningen deponerades lokalbedövning, mepivakain, dos 50 ml av 4 mg/ml (Carbocain, 20mg/ml, AstraZeneca AB) via endoskopet i trakeas distala del. Via den kuffade provtagningsslangen deponerades sedan totalt 5 x 60 ml steril NaCl-lösning. Återvunnen vätska samlades i ett kärl för att sedan delas upp på flera provrör som sedan transporterades kylda. Provet analyserades vid Klinisk kemi, UDS, för totalantal leukocyter (Advia 2120 Hematology System, Siemens). Provet för cytologi preparerades vid Klinisk kemi, UDS. Två olika koncentrationer av BAL-vätska användes för att göra cytospinpreparat till differentialräkning. Ett ocentrifugerat prov där 200 µl BAL-vätska blandades med 50µl albuminlösning och ett prov som centrifugerats i 400 x g i fem minuter och där pelleten och 200-300 µl av supernatanten blandades med 50µl albuminlösning. Efter att de torkat färgades cytospinpreparatet med May-Grünwald-Giemsas i ett automatiskt färgningssystem. Differentialräkning utfördes manuellt genom räkning av 200-300 celler per preparat.

Statistik

Statistiska jämförelser av data utfördes med hjälp av dataprogrammet MINITAB version 15. Då studien innefattar ett mindre antal djur och populationen inte är normalfördelad behandlades data som icke parametriska, och skillnader mellan grupper testades med Mann-Whitney test, med statistisk signifikansnivå $p < 0,05$.

RESULTAT

Hästar

Av de 29 shetlandsponnyer som ingick i studien var de flesta normalstora shetlandsponnyer, men även fyra individer som klassades som minishetlandsponny med mankhöjd om maximalt 86 cm inkluderades. Arton stycken av ponnyerna var ston, sju valacker och fyra hingstar. Stor variation rådde i hästarnas användningsområden, allt från sällskapshästar, till ponnyer som rids av barn, till ponnyer som tävlas i körning. Hos vissa ponnyer hade djurägaren en misstanke om luftvägsproblem eller hade upplevt att hästen uppvisade arbetsintolerans, medan de allra flesta av sin ägare betraktades som friska. Av samtliga ponnyer bedömdes tio stycken ha en trakealkollaps av grad I, tre ponnyer kollaps av grad II och tre ponnyer en kollaps av grad III. Ponnyer med kollaps av grad I klassades, tillsammans med de med helt normal form på trakea, som friska. Detta gjordes för att en sådan liten grad av kollaps var mycket frekvent förekommande och är av så ringa grad att den inte bör påverka hästen på något sätt. Ponnyer med kollaps av grad II och grad III klassades som sjuka. Medianvärde för grad av kollaps för de friska ponnyerna var 0 och medianvärde för de sjuka ponnyerna var 2,5 ($p = 0,0001$).

Av de 29 undersökta Shetlandspannyerna bedömdes alltså sex stycken ha en betydande kollaps av trakea och klassades som sjuka. Det visade sig vara åldersskillnad mellan gruppen av friska ponnyer och gruppen med trakealkollaps av grad II och III. Medianvärde för friska gruppen var 5 år medan medianvärde för de sjuka ponnyerna var 15 år ($p = 0,0006$).

Klinisk undersökning

Alla hästar var vid gott AT samt feberfria och trakealkollaps kunde inte diagnostiseras med palpation hos någon av hästarna. Ingen skillnad i hull kunde ses mellan grupperna, båda grupper innehöll ponnyer med normalt hull och något över normalt. Andningsfrekvens skiljde sig inte signifikant mellan grupperna, ingen häst uppvisade spontan hosta vid undersökningstillfället och samtliga var negativa vid hostprovokation. Vid lungauskultation hördes förstärkta andningsljud hos tre av de friska ponnyerna och fyra av de sjuka. Vid auskultation över trakea hördes förändrade andningsljud hos tre friska ponnyer och hos fem av de med trakealkollaps. Samma resultat framkom vid auskultation av lungor och trakea vid användning av re-breathing bag som vid auskultation utan re-breathing bag. Inget samband kunde ses mellan förändrade andningsljud och slemförekomst i trakea.

Endoskopi

Vid endoskopiundersökning av övre luftvägar bedömdes tre ponnyer ha ett ödematöst utseende i larynx. Samtliga dessa ponnyer hade trakealkollaps. Hos två av dessa, med kollaps av grad II respektive III, bedömdes ödemet vara av lindrig grad. Hos en ponny, med kollaps av grad III, bedömdes larynx som måttligt ödematöst. Follikelteckning i svalget sågs hos sju av hästarna. Hos tre av dessa bedömdes den som lindrig, hos två som lindrig-måttlig och hos en ponny som måttlig. En av ponnyerna med trakealkollaps hade follikelteckning i svalget. De flesta ponnyerna hade en hostreflex vid endoskopiundersökningen som bedömdes vara inom normalvariation. Åtta ponnyer hade dock en hostreflex som bedömdes vara lindrigt - måttligt ökad. Två av dessa hade trakealkollaps av grad II. Trakealslemhinnan bedömdes som lindrigt hyperemisk hos sex av hästarna. Fyra av dessa hade trakealkollaps, två stycken av grad II och två stycken av grad III. En av ponnyerna, med trakealkollaps av grad III, och hyperemisk slemhinna bedömdes även ha lindrigt ödem i trakealslemhinnan. Hos sex ponnyer förekom mucus i trakea. Två av dessa hade trakealkollaps medan fyra bedömdes som friska. Ackumulation, viskositet, lokalisation och färg för respektive individ anges i tabell 2.

Tabell 2. Bedömning av mucus i trakea hos sex individer.

Mucus	Individer					
	Sjuka		Friska			
Akkumulation	2,7	3	3	1	0,8	2
Viskositet	Lättflytande	Intermediär	Intermediär	Lättflytande	Intermediär	Intermediär
Lokalisation	Ventralt	Dorsalt	Ventralt	Lateralt	Ventralt	Ventralt
Färg	Färglöst-vitt	Vitt-färglöst	Vitt-färglöst	Färglöst	Vitt-färglöst	Vitt

Vid bedömning av Septum Thickness Score kunde tendens till bredare septum ses hos ponnyer med trakealkollaps jämfört med ponnyerna i den friska gruppen, där gruppen med

kollaps hade ett högre medianvärde (3,3), än den friska gruppen (2,8). Denna skillnad var dock inte statistiskt signifikant ($p = 0,0751$).

Trakealaspirat

Bakteriologi

Vid bakterieodling fanns växt av bakterier hos 22 ponnyer av de 28 som provtagits. I tabell 3 anges hur många ponnyer i varje grupp som hade tillväxt av vilka bakterier. Tre ponnyer hade växt av fler än en specificerad sort av bakterier. Detta kan inte utläsas i tabellen. Endast en ponny hade enbart sparsam växt av *S. zooepidemicus* i renkultur, hos övriga förekom alla specificerade bakterier i blandflora av sparsam eller måttlig grad. Hur många ponnyer som hade vilken grad av blandflora redovisas sist i tabellen.

Tabell 3. Bakterier i trakealaspirat.

	Friska (n=22)	Sjuka (n=6)
Sparsam växt av <i>S.zooepidemicus</i>	10	3
Sparsam ospecifik växt	0	2
Måttlig ospecifik växt	3	1
<i>Nicoletella semolina</i>	3	0
B-hemolyserande streptokocker	2	0
Sparsamt Actinobacilluspecies	1	0
Ovan bakt i sparsam blandflora	5	1
Ovan bakt i måttlig blandflora	8	1

Sjuka

Bakterieväxt fanns hos samtliga sex ponnyer med trakealkollaps. Två hade sparsam växt av *S. zooepidemicus*, var av en i sparsam blandflora. En ponny hade växt av enstaka kolonier av *S. zooepidemicus* i måttlig blandflora. Två ponnyer hade en ospecifik växt, en sparsamt och en måttligt. En ponny hade enbart växt av enstaka ospecificerade kolonier.

Friska

Bakterieväxt fanns hos sexton av de 22 provtagna friska ponnyerna. Hos sex ponnyer förekom ingen bakterieväxt. Sparsam växt av *S. zooepidemicus* förekom hos tio ponnyer. Av dessa tio hästar hade hälften även växt av en sparsam blandflora och andra hälften en måttlig blandflora. Hos två av dessa fanns även tillväxt av *N. semolina*. En ponny hade växt av enbart *N. semolina* i måttlig blandflora. Tre ponnyer hade måttlig ospecifik växt. Hos två hästar växte sparsamt med β -hemolyserande streptokocker i måttlig blandflora och hos en av dessa fanns även sparsam växt av actinobacilluspecies.

Cytologi

Sjuka

Hos de sex ponnyerna med trakealkollaps sågs enstaka neutrofiler hos fem stycken och en ponny hade ingen förekomst av neutrofiler i trakealinspirat, se tabell 4.

Friska

Hos femton av de 22 provtagna friska Shetlandsponnyerna kunde neutrofiler ses i trakealinspirat. Tretton av dem hade endast förekomst av enstaka neutrofiler. En individ hade lindrig förekomst av neutrofiler. Hos en ponny sågs måttlig-riklig förekomst av neutrofiler i trakealinspirat. Denna hade även intracellulära bakterier i neutrofiler, men inget mucus observerades i trakea vid endoskopiundersökningen. Den bakteriologiska undersökningen på denna ponnys trakealinspirat visade sparsam växt av β -hemolyserande streptokocker och actinobacillusspecies i måttlig blandflora. Hos sju friska ponnyer kunde inte några neutrofiler ses, se tabell 4.

Tabell 4. Förekomst av neutrofiler i trakealinspirat.

Neutrofilförekomst	Friska	Sjuka
Ingen	7	1
Enstaka	13	5
Lindrigt	1	0
Lindrigt-måttligt	1	0

Bronkoalveolärt lavage, BAL

Resultat av cellräkning och differentialräkning i preparat av BAL-vätska redovisas nedan i tabell 5.

Tabell 5. Totalantal vita blodceller och differentialräkning i BAL-vätska.

Cellräkning		Differentialräkning			
LPK	Neutrofiler %	Lymfocyter %	Makrofager %	Eosinofiler %	Mastceller %
200x10 ⁶	1	24	65	1	9
180x10 ⁶	3	27	65	0	5
180x10 ⁶	5	29	65	0	1
200x10 ⁶	10	27	59	0	4
320x10 ⁶	3	15	79	0	3
200x10 ⁶	4	29	62	5	0
260x10 ⁶	29	19	45	3	3
140x10 ⁶	0	32	64	1	3
70x10 ⁶	13	22	62	0,5	2,5

Samtliga provtagna ponnyer befann sig inom normalvariation med avseende på leukocytpartikelkoncentration, LPK. En av de friska ponnyerna och två av de med trakealkollaps hade högre andel neutrofiler i BAL-vätska än vad som accepteras som normalt.

DISKUSSION

En relativt stor andel av den undersökta gruppen Shetlandsponnyer i studien hade en onormal form på trakea. Den grupp som hade en trakealkollaps som bedömdes till grad I fick i denna studie ingå i gruppen som klassificerades som friska, då denna grad av förändring i luftstrupens lumen är mycket liten, nämligen mindre än 25 %. Detta kan jämföras med den bedömning som görs hos människa där det krävs att trakea kollapsar till minst 50 % för att det ska betraktas som trakeomalacia (Carden et al, 2005), som är motsvarigheten till djurens trakealkollaps. Den relativt låggradiga avsmalning av trakeas lumen som sågs hos ponnyerna med kollaps av grad I, bedömdes vara så liten att den inte påverkar ponnyerna på något sätt. Vid statistisk jämförelse av medianvärden för grad av trakealkollaps mellan de båda grupperna, friska och sjuka uppnås en statistiskt signifikant skillnad av grad av kollaps.

Tre av de sjuka ponnyerna hade inte av sina ägare observerats ha några symptom av trakealkollapsen, två av dessa hade kollaps av grad II och en av grad III. De tre andra sjuka hästarna hade uppvisat luftvägssymptom, två hade tidigare uppvisat så kraftiga symptom att de sökt veterinärvård för luftvägsproblem och då diagnostiserats med trakealkollaps. Den tredje hästen i denna grupp hade uppvisat lindrigare intermittenta symptom från luftvägarna. Detta resultat indikerar att Shetlandsponnyer kan ha trakealkollaps ända till grad III utan att uppvisa symptom av detta. Alternativt kan symptomen vara så låggradiga att ägaren inte

lägger märke till dem. Många Shetlandponnyer utför heller inte något ansträngande arbete och detta kan göra att ingen heller upptäcker en eventuell arbetsintolerans eller andra symptom som främst uppkommer vid ansträngning.

En markant åldersskillnad, som hade statistisk signifikans, kunde ses mellan den friska och den sjuka gruppen. Detta stämmer väl överens med uppgifter i litteraturen där trakealkollaps rapporteras ha ett progressivt förlopp, och att det är de äldre hästarna som har utvecklat kollaps av de högre graderna.

Tecken på samband mellan trakealkollaps och inflammation i trakea har till viss del kunnat ses i denna studie. Vid kontroll av svalgets utseende via endoskopet kunde tecken på irritation ses här på tre av hästarna i studien, varav samtliga hade trakealkollaps. Trakealslemhinnan uppvisade tecken på irritation genom hyperemi hos en frisk häst och hos fyra av hästarna med trakealkollaps. En av dessa hade ytterligare tecken på irritation genom att trakealslemhinnan var lindrigt ödematös till sitt utseende.

Bedömning av tjockleken hos septum mellan huvudbronkerna, Septum Thickness Score (STS), har traditionellt varit en parameter som bedöms vid undersökning av nedre luftvägarna (Koch et al, 2007). En bredare septum skulle vara tecken på att ett inflammationstillstånd råder i nedre luftvägarna. I denna studie uppnåddes inte en statistiskt signifikant skillnad mellan STS hos ponnyer med trakealkollaps och friska ponnyer. Gruppen med trakealkollaps hade dock ett högre medianvärde än den friska gruppen. Vid en studie som utvärderade STS hos hästar kom man fram till att ingen korrelation fanns mellan inflammation i nedre luftvägarna och STS. Man såg dock att hästar över tio års ålder hade ett signifikant högre STS än yngre hästar (Koch et al, 2007). Detta skulle kunna vara en bidragande förklaring till den skillnad som ändå finns i denna studie på shetlandsponnyer, då gruppen med trakealkollaps också är betydligt äldre än den friska gruppen.

Mängden mucus i luftvägarna är en parameter som väl korrelerar med andra parametrar som indikerar inflammation i nedre luftvägarna hos häst (Gerber et al, 2004). I försöket kunde mucus i trakea ses hos två av de sex sjuka ponnyerna och hos fyra av de friska. De båda ponnyerna med trakealkollaps och mucusförekomst hade en måttlig mängd mucus i trakea. Den ena av dem hade även hyperemisk trakealslemhinna och lindrigt ödem i larynx medan den andra inte hade några andra visuella tecken på inflammation. Ingen av de friska ponnyerna med mucus i trakea hade några andra visuella tecken på inflammation. Det är svårt att bedöma om någon skillnad råder mellan grupperna med avseende på mucusförekomst då det är ett så litet antal individer.

Vid cytologisk undersökning av trakealspirat för bedömning av neutrofilförekomst var det mest förekommande fyndet enstaka neutrofiler. Detta var fallet både i gruppen med friska och i gruppen med sjuka ponnyer. En större andel av de sjuka ponnyerna än av de friska hade förekomst av enstaka neutrofiler, men då mindre mängder neutrofiler kan förekomma i trakealspirat normalt (Whitwell och Greet, 1984), kan fynden inte sägas tyda på inflammation i trakea.

Bakterieodling från trakealspirat visade växt av bakterier hos största delen, 78,6 %, av ponnyerna i studien. Huvudsakligen förekom normalflora för hästens svalg i odlingarna. Noteras bör att bakterieväxt förekom i prov från samtliga ponnyer i gruppen med trakealkollaps medan de sex ponnyerna utan bakterieväxt alla befann sig i den friska gruppen. Ingen skillnad kunde ses i graden av tillväxt av bakterier mellan grupperna. Endast en ponny visade tecken på bakteriell infektion i trakea, med måttlig-riklig mängd neutrofiler i

trakealaspirat, som även innehöll intracellulära bakterier. Denna ponny tillhörde gruppen utan trakealkollaps. Att bakterier förekommer i trakea är normalt, då sekret från övre luftvägarna här blandas med sekret från de nedre luftvägarna, det är inte en steril miljö (Johnson och Fales, 2001). Det går heller inte att utesluta att positiva odlingsresultat till viss del kan bero på kontamination av bakterier från svalgget som följt med endoskopet ned i trakea, trots att provtagningskatetern var skyddad inne i endoskopets biopsikanal vid passage genom övre luftvägar och svalg. Den största delen av trakealaspiraten kunde vid cytologisk undersökning konstateras innehålla enstaka till lindrig mängd plattepitelceller från svalgget. På många av dessa celler kunde bakterier ses.

Analys av BAL-vätska visade ingen skillnad mellan grupperna i totalantal leukocyter. Ingen ponny hade heller ett så högt totalantal leukocyter att det betraktades som förhöjt. Två av ponnyerna i gruppen med trakealkollaps hade en större andel neutrofiler i BAL-vätska än vad som anses normalt. Den ena av dessa hade dock ett så lågt totalantal leukocyter att differentialräkningen inte bör betraktas som pålitlig. Den andra ponnyn hade 29 % neutrofiler, men inga tecken på bakteriell infektion i lungorna. En sådan stor andel neutrofiler utan bakteriell infektion tyder på RAO, vilket även överensstämmer med att denna ponny hade en måttlig mängd mucus i trakea. En ponny med trakealkollaps låg på gränsen till förhöjd andel eosinofiler i BAL-vätska medan övriga celler var inom normalvariation. Då eosinofilalet ligger i övre referensintervall, totalantal celler är normalt och hästen inte uppvisade några kliniska symptom från luftvägarna är det inte troligt att detta har någon klinisk betydelse. Förhöjd andel eosinofiler, utan samtidig förhöjning av andra inflammatoriska celler, sätts vanligen i samband med parasitinfektioner, ospecifik eosinofil pneumoni eller inflammation till följd av allergi (Dixon et al, 2007). Parasitstatus eller avmaskningsrutiner är inte kända hos någon av ponnyerna i studien. En av de friska ponnyerna uppvisade en något förhöjd halt neutrofiler i BAL-vätska utan samtidiga tecken på bakteriell infektion och en annan frisk ponny hade en ökad andel mastceller, så avvikande cellbild i BAL-vätska förekom även i den friska ponnygruppen.

Denna studie indikerar att visuella tecken på inflammation i slemhinnan, så som hyperemi och ödem i trakealslemhinnan och ödem i larynx har ett samband med trakealkollaps hos Shetlandponnyer. Däremot kan, med hjälp av de provtagningsmetoder som använts i denna studie, inget samband ses med andra parametrar som indikerar inflammation, så som mucusförekomst, förhöjd mängd neutrofiler i trakealaspirat och ökad andel neutrofiler i BAL-vätska. Det kan dock inte uteslutas att ett mer känsligt verktyg, så som slemhinnebiopsier, som inte har använts i denna studie, hade kunnat ge positiva resultat. Inte heller kan något tydligt samband ses mellan trakealkollaps och bakterieförekomst i trakea. När studien genomfördes uppvisade dock ingen av ponnyerna symptom av sin trakealkollaps i någon högre grad. Det är möjligt att om samma provtagning utfördes när hästarna inte var symptomfria skulle bilden bli en annan. Studien genomfördes under vår och höst och eftersom årstid ofta påverkar hur mycket symptom hästar med trakealkollaps uppvisar, på grund av skillnader i temperatur och fuktighet, är det även möjligt att tidpunkten på året för studiens genomförande kan påverka resultatet. Ytterligare studier med ett större antal individer behövs för att eventuellt kunna se tydligare samband mellan trakealkollaps och inflammation i trakealslemhinnan. Det skulle även vara intressant att undersöka och provta ponnyer med kollaps på nytt, när de är i en period där de uppvisar symptom, alternativt utföra studier under sommarhalvåret, vid högre temperaturer och högre luftfuktighet.

TACK TILL

Alla Shetlandsponnyägare som har visat sådant intresse för att delta studien med sina fantastiska ponnyer.

Miia Riihimäki för god handledning.

Eva Andersson för hjälp vid undersökningar och provtagning i fält.

Henry Stämpfli för hjälp vid undersökningar och provtagning i fält.

Inger Lilliehök och Klinisk kemi för analyser och instruktioner.

REFERENSLISTA

- Aleman, M., Nieto, J.E., Benak, J., Johnson, L.R. (2008) Tracheal collapse in american miniature horses: 13 cases (1985-2007), *J Am Vet Med Assoc* 8:1302-1306.
- Boogard, R., Huijsmans, S.H., Pijnenburg, M.W.H., Tiddens, H.A.W.M., de Jongste, J.C, Merkus, P.J.F.M. (2005) Tracheomalacia and bronchomalacia in children: Incidence and patient characteristics, *Chest* 5:3391-3397.
- Buback, J.L., Boothe, H.W., Hobson, H.P. (1996) Surgical treatment of tracheal collapse in dogs: 90 cases (1983-1993), *J Am Vet Med Assoc* 208:380-384.
- Carden, K.L., Boiselle, P.M., Waltz, D.A., Ernst, A. (2005) Tracheomalacia and Tracheobronchomalacia in Children and Adults, an In-depth Review, *Chest* 3: 984-1005.
- Carrig, C.B., Groenendyk, S., Seawright, AA. (1973) Dorsoventral flattening of the trachea in a horse and its attempted surgical correction: A case report, *J Am Vet Radiol Soc* 14: 32-36.
- Couëttil, L.L., Gallatin, L.L., Belvins, W., Khandra, I. (2004) Treatment of tracheal collapse with an intraluminal stent in a miniature horse, *J Am Vet Med Assoc* 225:1727-1732.
- Dallman, M.J., McClure, R.C., Brown, E.M. (1988) Histochemical study of normal and collapsed tracheas in dogs, *Am J Vet Res* 12:2117-2124.
- Dixon, P.M., Schumacher, J., Collins, N. (2007) Tracheal disorders. In: McGorunn, B.C., Dixon, P.M., Robinson, N.E., Schumacher, J. (2007) *Equine respiratory medicine and surgery*, 543-562, Philadelphia: Elsevier.
- Fenger, C.K., Kohn, C.W. (1992) Tracheal obstruction from tracheal collapse associated with pneumonia in a horse, *JAVMA* 11:1698-1700.
- Gerber, V., Straub, R., Marti, E., Hauptman, J., Herholz, C., King, M., Imhof, A., Tahon, L., Robinson, N.E. (2004) Endoscopic scoring of mucus quantity and quality: observer and horse variance and relationship to inflammation, mucus viscoelasticity and volume, *Equine vet. J.*, 36:576-582.
- Graham, S.B., Schilpp, D., Bradley, W.M., Cook, G., Gayle, J. (2010) Treatment of traumatic tracheal collapse with extraluminal titanium mesh screens, *Equine vet. Educ.* 22:557-563.
- Hawkins, E.C, DeNicola, D.B., Plier, M.L. (1995) Cytologic analyses of bronchoalveolar lavage fluid in the diagnosis of spontaneous respiratory tract disease in dogs: A retrospective study, *J Vet Intern Med* 6:386-392.
- Johnson, L. (2000) Tracheal collapse. Diagnosis and medical and surgical treatment, *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 30:1253-1266.
- Johnson, L.R., Fales, W.H. (2001) Clinical and microbiologic findings in dogs with bronchoscopically diagnosed tracheal collapse: 37 cases (1990-1995), *JAVMA* 9:1247-1250.
- Johnson, L.R., Pollard, R.E. (2010) Tracheal collapse and Bronchomalacia in Dogs: 58 cases (7/2001-1/2008), *J Vet Intern Med* 24:298-305.
- Koch, C., Straub, R., Ramseyer, A., Widmer, A., Robinson, N.E., Gerber, V. (2007) Endoscopic scoring of the tracheal septum in horses and its clinical relevance for the evaluation of lower airway health in horses, *Equine vet. J.*, 39:107-112.
- Mair, T.S., Lane, J.G. (1990) Tracheal obstructions in two horses and a donkey, *Veterinary Record* 126: 303-304.
- Martin, J. (1981) Dorsoventral flattening of the equine trachea in a pony, *Equine Pract* . 3:17-22.
- Powell, R.J., Du Toit, N., Burden, F.A., Dixon, P.M. (2010) Morphological study of tracheal shape in donkeys with and without tracheal obstruction, *Equine vet J.* 42:136-141.
- Robertson, J.T, Spurlock, G.H. (1986) Tracheal reconstruction in a foal, *JAVMA* 3:313-314
- Simmons, T. R., Petersen, M., Parker, J., Dietze, A., Rebhun, W. C. (1988) Tracheal Collapse Due to Chondrodysplasia in a Miniature Horse Foal, *Equine Pract.* 10:39-41.
- Tangner, C.H., Hobson, H.P. (1982) A retrospective study of 20 Surgically Managed Cases of Collapsed Trachea, *Veterinary Surgery* 11:146-149.

- Tate, L.P., Koch, D.B., Sembrat, R.F., Boles, C.L. (1981) Tracheal reconstruction by resection and end-to-end anastomosis in the horse, *J Am Vet Med Assoc* 178:253-258.
- Tetens, J., Hubert, J.D., Eddy, A.L, Moore, R.M. (2000) Dynamic tracheal collapse as a cause of exercise intolerance in a thoroughbred, *JAVMA* 5:722-724.
- White, R.A.S., Williams, J.M. (1994) Tracheal collapse in the dog- is there really a role for surgery? A survey of 100 cases, *J Small Anim Pract* 35:191-196.
- Whitwell, K.E., Greet, T.R.C. (1984) Collection and evaluation of tracheobronchial washes in the horse, *Equine vet. J.*, 16:499-508.
- Widdicombe, J.H., Pecson, I.S. (2002) Distribution and numbers of mucous glands in the horse trachea, *Equine vet. J.* 34:630-633.
- Yovich, J., Stashak, T. (1984) Surgical repair of a collapsed trachea caused by a lipoma in a horse. *Vet. Surg.* 13:217-221.