بررسی اثر اسیدوز بر برخی شاخصهای سیستم ایمنی ذاتی گوسفندان نژاد قزل

دکترعلی کارگری رضاپور[۱]*، دکتر پرویز نام آور[۱]، بابک باغبان زاده نوبری[۲]

چکیده

این مطالعه بمنظور بررسی اثر اسیدوز بر برخی شاخص‌های سیستم ایمنی ذاتی، در سه تیمار آزمایشی (گروه شاهد، اسیدوز تحت‌حاد، اسیدوز حاد) با ۵ تکرار و در قالب طرح چرخشی (*Change-over design*) انجام گرفت. القاء اسیدوز با استفاده از جیره با کنسانتره بالا صورت گرفت و برای ممانعت از بروز اسیدوز در گروه شاهد، از مونسین استفاده شد. در پایان هر دوره آزمایشی، خونگیری از ورید وداج به عمل آمد تا شمارش تعداد تام گلبولهای سفید، شمارش تفکیکی گلبولهای سفید و آزمایش فاگوسیتوز انجام گیرد. نهایتاً متوسط درصد نوتروفیل فاگوسیتوز کرده و متوسط تعداد مخمر فاگوسیتوز شده توسط هر نوتروفیل در هر تیمار تعیین شد. برای تعیین pH محتویات شکمبه، به روش رومینوسنتز نمونه مایع شکمبه گرفته شد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که اسیدوزحاد (pH <۵/۲) و تحت حاد (۵/۶ – ۵/۲ pH)، موجب کاهش بسیار معنی‌دار برخی اندیسهای فاگوسیتوز می‌گردد (p<۰/۰۱). بنابراین اسیدوز (حاد و تحت‌حاد) می‌تواند گوسفند را مستعد عفونتهای بعدی کند. در شمارش تام و تفکیکی گلبولهای سفید در تیمارهای مختلف، اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد (p> ۰/۰۵).

واژگان کلیدی: *فاگوسیتوز، گوسفند قزل، مونسین، نوتروفیل.*

The effect of acidosis on some markers of natural immune system of *Gezel* sheep

Kargari Rezapour, A.[1] , Namavar, P.[1] , Baghbanzadeh Noubari, B.[2]

1-Department of Domestical Sciences, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Tabriz Branch, Tabriz, Iran
2-Islamic Azad University, Kazeron Branch, Kazeron, Iran

The study was performed in a change-over design, by three treatments (control, sub-acute acidosis, and acute acidosis groups) and 5 replicates. Induction of acidosis, was performed by fed a diet of over concentrate. The control treatment received monensin as an inhibitory agent of acidosis. At the end of each experimental period, blood samples were collected from jugular vein for total and differential count of white blood cells and also phagocytosis test. Finally, the average percent of neutrophils that had phagocytic particles and average number of phagocytosed yeast per neutrophil were assessed. In order to measure the pH value of rumen, ruminal fluid was taken by rumenocentesis. The results showed that both acute (pH<5.2) and sub-acute acidosis (pH 5.2-5.6) significantly suppress phagocytosis indices (p<0.01). Thus, acidosis may predisposes sheep to subsequent infections. There was no significant difference in total and differential counts of white blood cells in different treatments (p>0.05).

Key words: *Gezel sheep, Monensin, Neutrophil, Phagocytosis*

مقدمه

بیماری اسیدوز یا عارضه پرخوری با غلات، یک اختلال گوارشی است که بدلیل استفاده ناگهانی از کنسانتره با نشاسته بالا (کربوهیدراتهای زود تخمیر) در جیره ایجاد شده و متعاقباً pH شکمبه به پایینتر از محدوده طبیعی افت پیدا می‌کند. این عارضه کراراً در پرواربندیها مشاهده می‌شود (۲). بدلیل تخمیر سریع این کربوهیدراتها، pH شکمبه کاهش پیدا می‌کند و زمینه رشد برای دسته‌ای از باکتریها موسوم به «باکتریهای تولیدکننده اسید لاکتیک» مساعد می‌شود. گونه‌های متعلق به جنس لاکتوباسیلوس و همچنین استرپتوکوکوس بویس از مهمترین این باکتریها هستند (۳). از جمله نشانه‌های بالینی لاکتیک اسیدوز عبارتست از: کاهش مصرف غذا، کاهش pH محتویات

۱-گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران(a.rezapour@gmail.com)
۲- دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، کازرون، ایران

شکمبه، آسیب شدید مخاط دستگاه گوارشی و حتی زخمی شدن آن (٦). عارضه گاه بحدی شدید است که می‌تواند منجر به مرگ دام شود. براساس علایم بالینی و آزمایشگاهی، اسیدوز به سه حالت کلی تقسیم‌بندی می‌شود:

الف. اسیدوز شکمبه‌ای تحت حاد: اساساً فاقد علایم بالینی خاص بوده، میزان pH شکمبه ۵/۵–۵ و غلظت تام اسیدهای چرب فرار (اسید استیک، اسید پروپیونیک و اسید بوتیریک) افزایش یافته است ولی غلظت اسید لاکتیک تجمع یافته در شکمبه بیش از ۱۰–۵ میلی‌مول در لیتر نیست. فلور میکروبی شکمبه عمدتاً از باکتریهای گرم منفی تشکیل شده و تعداد باکتریهای گرم مثبت نیز رو به افزایش است.

ب. اسیدوز حاد: دارای علایم بالینی (افزایش تعداد ضربان قلب و تعداد تنفس، دهیدراتاسیون و تجمع مایعات در شکمبه) و pH شکمبه کمتر از ۵ است. و اسید لاکتیک تجمع یافته در آن تا ۳۰۰ میلی‌مول درلیتر می‌باشد. تعداد تک یاخته های شکمبه بشدت کاهش می یابد. فلور میکروبی غالب در شکمبه باکتریهای گرم مثبت است که اکثراً از جنس لاکتوباسیل (Lactobacillus) می باشند.

ج. اسیدوز فوق حاد: علایم بالینی اسیدوز حاد بطور قوی‌تر و شدیدتری دیده می‌شود. و در صورت عدم درمان سریع، منجر به مرگ دام خواهد شد (۱۱)

البته اون و همکاران (۱۹۹٦) مرز کمتر از۵/۲ – ۵ را اسیدوز حاد و محدوده ۵/٦ – ۵/۲ را اسیدوز تحت‌حاد می‌دانند (۱۳). عوارض مختلفی به اسیدوز نسبت داده شده که از جمله آنها می‌توان به: التهاب و تورم بافت سم (٤)، جابجایی و یا زخم شیردان (١٦) و کاهش مقاومت به بیماری‌هایی از قبیل بیماری‌های تنفسی (۱۱) اشاره کرد. بویژه مورد اخیر و ابتلا به بیماریهای عفونی سالمونلایی، کلستریدیایی، کوکسی‌دیایی و قارچی (۹)، وجود این احتمال که اسیدوز موجب تضعیف سیستم ایمنی و زمینه‌ساز مخاطرات بعدی است را تقویت می‌کند. سیستم ایمنی ذاتی اولین سد دفاعی دام در برابر عوامل میکروبی مهاجم است و در این مورد نوتروفیل نقش حائز اهمیتی دارد (١٦ و ۹). بدین منظور مطالعه مداخله‌ای طراحی‌شد که با ایجاد تجربی اسیدوز تحت‌حاد و حاد، شمارش گلبولهای سفید (تام و افتراقی) و آزمایش فاگوسیتوز – بعنوان شاخصی از سیستم ایمنی ذاتی و بیانگر میزان فعالیت سلولهای فاگوسیت‌کننده نظیر نوتروفیل– انجام گیرد تا ارتباط اسیدوز و سیستم ایمنی ذاتی آشکار گردد.

مواد و روش کار

طرح آزمایشی و نگهداری حیوانات: این مطالعه بصورت طرح چرخشی (change-over design) طراحی و اجرا شد. تعداد ۵ رأس بره نر نژاد قزل با متوسط وزن ۲ ± ۲۷/۵ کیلوگرم انتخاب و مدتی در باکسهای انفرادی متابولیک مورد تغذیه با جیره موسوم به جیره استراحت (جدول یک) قرار گرفتند تا سازگاری لازم با محیط جدید پرورش صورت پذیرد. همچنین در این مدت از بره‌ها خونگیری بعمل می‌آمد تا با شرایط واقعی آزمایش سازگارتر شوند. بصورت تصادفی در هر دوره آزمایشی جیره‌های تیمار صفر و یک و دو در اختیار بره‌ها قرار گرفت. کل مطالعه در سه دوره آزمایشی انجام شد و هر دوره آزمایشی ٦ روز بود که نمونه‌گیری در روز ٦ انجام پذیرفت.جیره تیمار صفر یا گروه شاهد از لحاظ ترکیبات مغذی شبیه سایر تیمارهاست و تنها تفاوت آن، وجود ۳۰ میلی‌گرم مونسین در هر کیلوگرم غذاست که این مقدار مونسین، مانع از بروز اسیدوز در گوسفند می‌شود (مطالعه منتشر نشده شخصی). جیره‌های تیمار یک و دو بترتیب دارای ۱۰ و صفر میلی‌گرم مونسین بود. هدف از استفاده از جیره یک، القاء اسیدوز تحت‌حاد و هدف از جیره دو، القاء اسیدوز حاد بود.

خونگیری: در پایان هر دوره آزمایشی، نمونه خون هپارینه (۱۰ u/ml) از ورید وداج و با استفاده از سرنگ و به فاصله دو ساعت پس از خوراک‌دهی گرفته شد. با توجه به اینکه

خوراک‌دهی وعده نخست هر روز در ساعت ۹:۰۰ صبح بود، زمان خونگیری ساعت ۱۱:۰۰ انتخاب شد.

شمارش تام و تفکیکی گلبولهای سفید: گلبولهای سفید موجود در نمونه خون با استفاده از محلول رقیق‌کننده گلبول سفید به نسبت ۲۰: ۱ رقیق شده (۵۰λ خون با ۹۵۰λ رقیق کننده)، بمدت ۲ دقیقه عمل مخلوط سازی توسط میکسر مکانیکی انجام گرفت. به آرامی اندکی از این مخلوط به لام هماسیتومتر انتقال داده شد و لام مدتی در پلیت مرطوب قرار داده شد تا سلولهای در حرکت آن، ساکن شوند. همه سلولهای مورد مشاهده در ٤ مربع کناری شمارش شده، نتیجه در فاکتور ۵۰ (عکس رقت × ۱۰ × ¼) ضرب شد (۸). پس از تهیه گسترش خونی و رنگ‌آمیزی آن بروش گیمسا، شمارش تفکیکی هر رده گلبول سفید بعمل آمد. برای رنگ‌آمیزی با این روش، پس از تثبیت گسترش سلولی با متانول و تبخیر الکل، بمدت ۲۰ دقیقه با رنگ کاری گیمسا (محلول ۱۰ برابر رقیق شده با بافر فسفات سالین با pH ۷ – ۷/۲) لام پوشانده شد و پس از این مدت با آب مقطر شستشو شد. پس از خشک شدن لام و بررسی میکروسکوپی (۱۰۰×)، نهایتاً فراوانی نسبی هر یک از رده-های گلبول سفید (نوترفیل، لمفوسیت، مونوسیت، ائوزینوفیل و بازوفیل) تعیین شد (۱).

آزمایش فاگوسیتوز: بدین منظور از خون تام هپارینه و مخمر کاندیدا آلبیکنس(Candida albicans) طبق روش بروسئو و همکاران (۷) استفاده شد. روش کار بشرح زیر است:

۱- تهیه کشت ٢٤ ساعته مخمر کاندیدا آلبیکنس در محیط آبگوشت مالتوز.

۲- سانتریفوژ محیط کشت بمدت ۱۰ دقیقه، دور ریختن مایع رویی.

۳-دو بار شستشوی مخمر با اضافه کردن سالین نرمال استریل به پلیت مخمر و سپس سانتریفوژ ۵ دقیقه‌ای در ۲۰۰۰ دور. نهایتاً ۲ سی‌سی سالین نرمال به مخمر شسته شده اضافه می‌شود تا سوسپانسیون مخمر تشکیل شود. سوسپانسیون باید واجد $۱۰^{۷}$ ×٤ جسم مخمری در هر میلی‌لیتر باشد. برای شمارش، ۱۰۰λ از سوسپانسیون برداشت شده و با ۹۰۰λ سالین نرمال مخلوط می‌گردد تا رقت ۱:۱۰ حاصل شود. چند قطره از این محلول به لام هموسیتومتر انتقال داده می‌شود. تعداد ۵ مربع از مربع بزرگ وسطی (واجد ۲۵ مربع کوچک) هموسیتومتر شمارش شده، برای محاسبه بصورت زیر عمل شد:

۱۰ × ۵ × فاکتور رقت (۱۰) × تعداد شمرده‌شده = تعداد مخمر در هر میلی‌لیتر

سپس به نسبت لازم، تا حصول به $۱۰^{۷}$ ×٤ مخمر در هرمیلی‌لیتر، رقیق‌سازی انجام گردید.

۴- انکوباسیون نیم ساعته سوسپانسیون مخمر با مقدار هم حجم پلاسمای گوسفند.

۵- مخلوط کردن و انکوباسیون یک ساعته ۵۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون مخمری انکوبه شده با پلاسما (مربوط به مرحله ۳) با ۵۰۰ میکرولیتر خون تام هپارینه.

۶- چند گسترش شعله شمعی تهیه و بروش گیمسا رنگ آمیزی می‌شدند.

۷- با استفاده از عدسی شیئی ۱۰۰× میکروسکوپ نوری شمارش انجام گرفت.

در هر گسترش در مجموع ۵۰ نوتروفیل از لحاظ ویژگیهای زیر مورد مطالعه قرار گرفت: (الف) درصد نوتروفیل‌هایی که فاگوسیتوز انجام داده‌اند. (ب) متوسط تعداد مخمر بلعیده شده توسط هر نوتروفیل.

اخذ نمونه شکمبه و اندازه‌گیری pH: روشی که در ذیل اشاره می‌شود، اساساً برای گاو طراحی شده است ولی با توجه به اختصاصات آناتومیکی گوسفند، اصول کلی روش برای کار بمنظور امکان پذیر بودن اجرای روش در گوسفند، اندکی تغییر داده شده است (۱۲): گوسفند بکمک عامل به پهلوی راست خوابانده شد. پس از ضدعفونی ناحیه تهیگاه

سمت چپ (بفاصله ۱۵ سانتی‌متر پایین‌تر از کمر و ۱۰ سانتی‌متر پشت دنده آخر) سرنگ ۲۵ سی‌سی، بصورت عمود به شکمبه وارد شد و سپس اقدام به کشش مایع شکمبه شد. مقدار نمونه گرفته شده با این روش حدوداً ۲ سی‌سی بود.در تیمارهای صفر و یک، نمونه‌گیری از مایع شکمبه در روز ۵ و ٦ اجرای آن تیمار تهیه شد ولی در مورد تیمار دو (تیمار اسیدوز حاد)، بدلیل مشاهده علایم بالینی اسیدوز در همان روز اول و دوم، نمونه‌گیری از مایع شکمبه در روز دوم بعمل آمد.

نتایج

مقدار متوسط pH مایع شکمبه در تیمارهای شاهد، تیمار یک و تیمار دو (صفر تا دو) بترتیب عبارت بودند از: (±۰/۱٤) ٥/٧٦ ، (±۰/۱۱)٥/۲۸۷ ، (±۰/۰۷)٥/۰٦۲ (نمودار یک). بر اساس آنالیز واریانس (ANOVA test) و با استفاده از آزمون Tukey، اختلاف معنی‌دار درون گروهی مشاهده نشد (p<۰/۰۵). بعبارت دیگر، تفاوت فردی گوسفندان در حد معنی‌دار نبود. متوسط میزان pH تیمار شاهد (تیمار صفر) بصورت معنی‌داری بیشتر از تیمارهای یک و دو بود (p<۰/۰۵). همچنین اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای یک و دو مشاهده شد (p<۰/۰۵).

از لحاظ علایم بالینی در تیمار شاهد، سلامت عمومی، قوام مدفوع و اشتها بصورت طبیعی بود. و علیرغم اینکه در فرآوری جیره غذایی، جو مورد استفاده بصورت پودری بوده و بالقوه می‌توانست منجر به بروز اسیدوز شود، ولی عملاً در حضور مونسین (بمیزان ۳۰ میلیگرم در هر کیلوگرم جیره) علایم بالینی اسیدوز مشاهده نشد. گوسفندان بخوبی در دوره سازگاری به شرایط زندگی در باکس عادت کرده بودند و دپرسیون مشاهده نشد. در تیمار یک یا تیمار اسیدوز تحت حاد، دامها عموماً از لحاظ بالینی سلامت عمومی داشتند ولی درجاتی از اسهال (البته در حد نرم شدن مدفوع و نه آبکی شدن) در دامها مشاهده شد. این دامها معمولاً رغبت کمی به غذا داشتند و اگرچه مقدار غذای تعیین شده روزانه را دریافت می‌کردند ولی نسبت به سایرین با اشتهای کمی غذا می‌خوردند. در تیمار دو یا تیمار اسیدوز حاد، دپرسیون شدید، اسهال و قطع اشتها دیده شد. بطوریکه حتی گوسفندانی که در دوره‌های قبلی آزمایش، خوش‌اشتهاتر از سایرین بودند، اغلب اوقات پشت به غذا ایستاده، تمایلی به اخذ غذا نداشتند. مقدار خوراک مصرفی روزانه، به حد نصف و کمتر کاهش یافته بود. سعی اولیه آنها بر استفاده از علوفه غذا بود و در بازرسیهای روزانه و تعویض خوراک روزانه اغلب مشاهده می‌شد که بخش عمده کنسانتره بصورت دست نخورده باقیمانده است. بتدریج علایم دپرسیون شدیدتر شد و دو رأس از گوسفندان ظرف سه روز پس از آزمایش تلف شدند. نتایج مربوط به شمارش تام و تفکیکی گلبولهای سفید در تیمارهای مختلف در جدول ۲ آورده شده است. در بررسی آماری میانگین داده‌ها، اختلاف آماری معنی‌دار بین هیچکدام از تیمارها مشاهده نشد (p>۰/۰۵).

در شکلهای ۱ و ۲ تصویر میکروسکوپ نوری آزمایش فاگوسیتوز نشان داده شده است. میانگین درصد نوتروفیلهای فاگوسیتوز کرده در تیمارهای مختلف (صفر تا دو) بترتیب (±۲/۵۹) ۹٤/٥، (±۲)۲٦/۰ و (±۱/۱۹)۷/٥ و میانگین تعداد جسم مخمری فاگوسیتوز شده توسط هر نوتروفیل در همان تیمارها، بترتیب (±۰/۰۷)۳/۸۸، (±۰/۱٦)۲/۰٥ و (±۰/۱٦)۰/٦۲ بود. میانگین درصد فاگوسیتوز تیمارهای یک و دو بصورت بسیار معنی‌دار کمتر از تیمار شاهد بود (p<۰/۰۱). همچنین اختلاف بسیار معنی‌دار بین تیمار اسیدوز حاد (تیمار دو) و تیمار اسیدوز تحت‌حاد (تیمار یک) مشاهده شد (p<۰/۰۱). در آنالیز میانگین تعداد جسم مخمری فاگوسیتوزشده توسط هر نوتروفیل در تیمارهای مختلف، نتایجی شبیه آنچه در مورد درصد فاگوسیتوز بیان شد، مشاهده گردید. بنابراین در

مجموع می‌توان چنین اظهار نظر نمود که میزان کاهش قدرت فاگوسیتوز با شدت اسیدوز رابطه مستقیم دارد. و از آنجا که درصد فاگوسیتوز و متوسط تعداد جسم فاگوسیتوزشده، شاخصی از ارزیابی سیستم ایمنی ذاتی می‌باشند، می‌توان چنین اذعان نمود که اسیدوز موجب تضعیف سیستم ایمنی ذاتی می‌شود. که احتمال ابتلا به بیماریهای عفونی متعاقب آنرا افزایش می‌دهد.

بحث

بر اساس نتایج بعمل آمده در مورد متوسط میزان pH محتویات شکمبه و علایم بالینی مورد معاینه، متوسط میزان pH محتویات شکمبه در تیمار دو تقریباً در محدوده اسیدوز حاد و در تیمار یک، در محدوده اسیدوز تحت حاد است. که درتطابق با یافته‌های اون و همکاران (۱۹۹٦) می‌باشد. علایم بالینی اسیدوز مشاهده شده (بی‌اشتهایی، گنگی، توقف حرکات شکمبه، اسهال، ترشحات بینی، افزایش تعداد ضربان قلب و تعداد تنفس) در تطابق با یافته‌های سایر محققان است (۱۱ و ١٤). و همانند مطالعه پاترا و همکاران (۱۹۹٦) تعدادی از گوسفندان مبتلا به اسیدوز شدید تلف شدند.

همانطور که در بخش روش کار اشاره شد، نمونه مایع شکمبه در تیمار دو، دو روز پس از آغاز تیمار اسیدوز حاد بود که نتایج حاصله قابل مقایسه با پاترا و همکاران (۱۹۹٦) است که مقدار pH محتویات شکمبه را دو روز پس از القاء اسیدوز، ۵/۰۰ ذکر کرده‌اند.

هیچ مقاله‌ای که حاکی از کار محققان در مورد فاگوسیتوز در گوسفند (بطور اعم) و در گوسفندان اسیدوتیک (بطور اخص) باشد یافت نشد وتنها منابع ۹ و ۱۱ به وجود نوعی استعداد در دامهای اسیدوتیک به کسب عفونتهای مختلف، اشاره کرده‌اند هر چند از مکانیسم احتمالی این استعداد ذکری به میان نیامده است. مطالعات بعمل آمده در مورد موش رت نشان داده است که اسیدوز متابولیک موجب کاهش فاگوسیتوز و میکروب‌کشی نوتروفیل‌های این حیوان می‌شود (۵). اسیدوز متابولیک مزمن (حدوداً یک ماهه) موجب کاهش قدرت کموتاکسی و مهاجرت نوتروفیلها در گوسفندان شده است (۱۰). اینکه اسید لاکتیک (ایزومری D یا L) موجب کاهش عملکرد نوتروفیل شده است و یا افزایش کورتیکوستروئیدها باعث ایجاد استرس و اختلال متابولیک شده است، در حال حاضر مشخص نیست و نیازمند بررسی بیشتر می باشد .

تشکر وسپاسگزاری

این مطالعه با استفاده از اعتبارات پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز انجام گرفته است. از زحمات آقای حسین رضاپور بخاطر قبول زحمت عکاسی از میکروسکوپ نوری و از آقای ابراهیم شرقی کارشناس میکروبیولوژی کمال امتنان را داریم.

فهرست منابع

۱. عامری مهابادی، م، ۱۳۷۸، روشهای آزمایشگاهی هماتولوژی دامپزشکی، انتشارات دانشگاه تهران، صفحات ٤۱-٤۰.

2.Ahrens. FA., (1967): Histamine, lactic acid, and hypertonicity as factors in the development of rumenitis in cattle, American Journal of Veterinary Research, 28:1335-1342.

3.Allison MJ, Robinson IM, Dougherty RW, Bucklin JA., (1975): Grain overload in cattle and sheep: changes in microbial populations in the caecum and rumen, American Journal of Veterinary Research, 36:181-185.

4.Andersen, P. H., (1994): Portal Infusion of Low Dosage Endotoxin: A Model Simulating Translocation of Ruminal

Endotoxin in Cattle, Acta Vet.Scand, 35: 111 - 114.
5.Beachy, J.C., L.E., Weisman, (1993), Acute asphyxia affects neutrophil number and function in the rat, Critical Care Medicine, 21(12):1929-1934.
6.Braun U, Rihs T, Schefer U., (1992): Ruminal lactic acidosis in sheep and goats, Veterinary Record, 130: 343-349.
7.Brousseau P., Payette Y., Tryphonas H., (1999): manual of immunological methods, CRC press, 45-46.
8.Chanarian, I., (1989): Laboratory hematology (an account of laboratory techniques), Churchill Livingstone, pp 9-12.
9.Forsberg N.E., (2004): Recent insights into ruminant immune function: effects of stress and immunostimulatory nutritional products, Florida Ruminant Nutrition Symposium, pp. 81-92.
10.Hofirek, B., Slosarkova, S., Ondrova, J., (1995), Effect of chronic metabolic acidosis on migration activity of polymorphonuclear leukocytes in sheep, Veterinary Medicine, 40(6):171-175.
11.Matthias J., Enemark D., Jørgensen R.J., Enemark P.S., (2002): Rumen acidosis with special emphasis on diagnostic aspects of subclinical rumen acidosis: a review, Veterinarija ir Zootechnika. T. 20 (42).
12.Nordlund, K.V., Garrett, E.F., Oetzel. G.R., (1995): Herd-based rumenocentesis: a clinical approach to the diagnosis of subacute rumen acidosis in dairy herds, Compendium Continual Education Practice of Veterinary, 17(8): pp 48-56.
13.Owens F., Secrist D., Hill J., Gill D., (1996): A new look at acidosis, Proceeding of Southwest Nutrition Management Conference, Phoenix A-Z, pp 1-6.
14.Patra, R.C., Lal, S.B., Swamp, D., (1996): Biochemical profile of rumen liquor, blood and urine in experimental acidosis in sheep, Small Ruminant Research, 19: 177-180.
15.Rebhun W.C., 1995: Diseases of Dairy Cattle. Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 530.
16.Sartorelli, P., Paltrinieri, S., Agnes, F., (1999): Non-specific immunity and ketone bodies. I: *In vitro* studies on chemotaxis and phagocytosis in ovine neutrophils, Journal of Veterinary Medicine, A 46, Pp. 613–619.