

Klinisk gradering av hästens luftvägsstatus

En jämförande studie av kliniska graderingsprotokoll samt deras relation till luftvägshälsa och neutrofilförekomst i BAL-vätska

Elin Hernlund

Handledare: John Pringle
Inst. för Kliniska Vetenskaper
Biträdande handledare: Miia Riihimäki
Inst. för Kliniska Vetenskaper

Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och
husdjursvetenskap
Veterinärprogrammet

Examensarbete 2008:20
ISSN 1652-8697
Uppsala 2008

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

SAMMANFATTNING.....	3
SUMMARY.....	3
INLEDNING.....	4
Förkortningar.....	4
Bakgrund.....	5
RAO.....	5
IAD.....	6
Diagnostik.....	6
MATERIAL OCH METODER.....	8
Kliniska data.....	8
Hästar och studieupplägg försök 1.....	9
Hästar och studieupplägg försök 2.....	9
Klinisk undersökning.....	9
Endoskopiundersökning.....	11
Lungsköljprover –BAL.....	12
Graderingsprotokoll för inflammatoriska luftvägssjukdomar hos häst.....	13
Protokoll enligt Tesarowski et al.....	13
Protokoll enligt Hare et al.....	15
Protokoll enligt Naylor et al.....	16
Protokoll enligt Rush et al.....	16
Egenutformat graderingsprotokoll.....	17
RESULTAT.....	19
Helhetsbedömning av luftvägsstatus.....	19
Korrelationsanalys.....	19
DISKUSSION.....	19
LITTERATURFÖRTECKNING.....	21

SAMMANFATTNING

De inflammatoriska luftvägssjukdomarna hos häst har en relativt outredd patogenes. Det finns många brister i förståelsen av sjukdomarna och detta gör att definitionen av de olika sjukdomstyperna är svår och diffus. Trots ett antal moderna tekniker och hjälpmedel är diagnostiken utmanande. Ingen gold standard är utarbetad, utan en sammanvägd bild från flera undersökningar samt anamnes ger diagnos. Det har inom forskarsamfundet statuerats att det finns ett behov av ett standardiserat kliniskt graderingssystem för att underlätta diagnostiken [1]. En gemensam mall bör utformas för hur hästens luftvägsstatus skall bedömas vid klinisk undersökning. De graderingsprotokoll som inom forskningen används idag, inkluderar varierande parametrar vilka graderas på olika sätt. Vissa protokoll är detaljerade medan andra är grovhuggna till sin utformning. Syftet med denna studie var att jämföra olika typer av kliniska graderingsprotokoll för inflammatoriska luftvägssjukdomar hos häst och deras relation till mätbart indicium av inflammation i lungsköljprovvätska. Protokollen har hämtats från publicerade artiklar inom det aktuella området. Ett egenutformat graderingsprotokoll ingår även i den jämförande studien.

Kliniska data från 70 undersökningstillfällen (44 hästar) som ingått i två forskningsförsök vid SLU har använts för att kunna göra en jämförelse av graderingsprotokollen. De registrerade och graderade parametrarna från undersökning av hästar har översatts för att få en total poängsumma för varje häst enligt vart och ett av protokollen. Pearsonkorrelation har använts för att studera det matematiska sambandet mellan de olika metodernas bedömning av hästarna. Graderingspoängen har också korrelerats till den kliniska och anamnestiska helhetsbedömning, angående närvaro av inflammatoriskt eller ickeinflammatoriskt luftvägslidande, som forskarteamet vid SLU gjort samt till procenttalet neutrofiler i BAL-vätskan från hästarnas lungsköljprover.

Resultaten visar att de kliniska graderingsprotokollen trots varierande komplexitet har en liknande förmåga att visa på övergripande respiratorisk hälsa eller sjukdom hos hästar med "recurrent airway obstruction", (RAO) /"inflammatory airway disease" (IAD) och kliniskt friska hästar. Däremot finns ingen samstämmighet mellan neutrofilförhöjning i BAL, som objektivt mått på luftvägsinflammation, och något av de undersökta graderingssystemen. Den parvisa korrelationen mellan individuella graderingssystem varierade också när använda på samma grupp hästar. Vidare undersökning av graderingssystemen, till exempel genom faktoranalys, kan ge vägledning i vilka kliniska parametrar som bör ingå i ett standardiserat graderingsprotokoll som kan användas internationellt.

SUMMARY

Respiratory disease with airway inflammation as main characteristic is common in the horse. It is a syndrome that is not yet fully understood. The etiology, pathogenesis and classification into different disease states are subjects for discussion and under continuous revision. Despite a number of modern techniques, the diagnostic

procedure is challenging. There is no test considered to be gold standard when diagnosing these diseases.

The clinical examination remains an important approach to the horse with suspected respiratory disease. The need for a standardized clinical scoring system for the equine airways has been addressed by clinicians and researchers [1]. The clinical scoring systems used today are of varying complexity and contain different parameters that are graded in various ways. The aim of this study was to compare different clinical scoring systems for inflammatory airway disease in the horse and their relation to measured indices of inflammation in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and to clinical field status. Four of the protocols used in the study were taken from publications in the field of interest and one has been developed by the author of this under graduate thesis.

Data collected from 70 clinical examinations (44 horses) have been used to compare the clinical scoring systems. The registered parameters were graded according to the different protocols and a total clinical score was achieved for each examination. Pearson correlation was used to study the covariance between the clinical scores from the different protocols and their relation to neutrophil elevation in BALF and clinical status.

The results show that clinical scoring systems of varying complexity were of approximately equal value in predicting overall respiratory health or disease in horses with RAO/IAD versus clinically normal horses. It appears however that none of the scoring systems examined in this group were predictive of neutrophil elevation in BALF as an objective measure of airway inflammation. The pair-wise correlation between individual scoring systems also varied when used on the same group of horses. Future refinement of scoring systems, possibly using individual factor analysis, may aid in identifying key clinical findings of value in a scoring system that could be standardized for interlaboratory use.

INLEDNING

Förkortningar

Förklaring av förkortningar som förekommer i texten:

RAO - Recurrent Airway Obstruction, Kvickdrag

IAD - Inflammatory Airway Disease

BAL - Bronkoalveolärt lavage, lungsköljning

BALF - Bronkoalveolar lavage fluid (vätska)

COPD – Chronic Obstructive Pulmonary Disease, Kronisk obstruktiv lungsjukdom (KOL) inom humanmedicin. Inom hästmedicin har termen tidigare använts framförallt för att beskriva hästar med RAO, men även som en paraplybenämning för hästar med en klinisk bild som stämmer bättre överens med IAD [4].

SPA-COPD – Summer Pasture Associated COPD, RAO-tillstånd hos häst som uppträder i betesmiljö på sommaren.

Bakgrund

Inflammatoriskt luftvägslidande hos häst är ett sjukdomstillstånd som har varit känt sedan länge. Den klassiska formen, kvickdrag, beskrevs redan för drygt hundra år sedan av Dr. Magner [2]. Dr Magner presenterar orsaker till tillståndet som inte går i linje med dagens uppfattningar. Trots den långtida kännedomen om sjukdomen råder fortfarande oklarhet i förståelsen av etiologi och patogenes och en oenighet om hur de diagnostiska kriterierna skall sättas upp. Den kliniska bilden varierar mycket beroende på vilken typ och vilken grad av inflammatorisk luftvägssjukdom hästen lider av. Allt ifrån en lindrig prestationsnedsättning till uppenbara svårigheter att andas kan ses. Idag delas de inflammatoriska luftvägssjukdomarna upp i två sjukdomstyper: RAO och IAD. Skillnader och samband mellan dessa båda typerna har länge varit ett ämne för debatt bland forskare och kliniskt verksamma veterinärer. För den klassiska sjukdomen kwickdrag (benämns idag RAO) är symtomen normalt tydliga vid klinisk undersökning medan en häst som får diagnosen IAD kan ha kommit att utredas endast på grund av en prestationsnedsättning under hård ansträngning. Denna uppenbara skillnad i kliniska symtom och den subtilitet med vilken sjukdomen kan presentera sig ställer krav på diagnostiken.

Detta arbete inriktas på den kliniska undersökningen som diagnostisk metod. Tillsammans med anamnes utgör den det enkla och alltid tillgängliga sättet att ta sig an en häst som misstänks lida av en inflammatorisk luftvägssjukdom. Utformandet av ett validerat kliniskt graderingssystem skulle kunna underlätta arbetet för forskare och klinisk verksamhet genom att hjälpa till att strukturera den kliniska undersökningen och betona vilka parametrar som bedöms talande för ett sjukdomsuttryck och också möjliggöra mer jämförbar och tydlig forskning på området. Det har inom forskarsamfundet statuerats att det finns ett behov av ett standardiserat kliniskt graderingssystem för att underlätta diagnostiken. De graderingsprotokoll som används idag inkluderar olika parametrar vilka graderas på varierande sätt. Vissa protokoll är detaljerade medan andra är mkt grovhuggna till sin utformning. Syftet med denna studie var att jämföra olika typer av kliniska graderingsprotokoll för inflammatoriska luftvägssjukdomar hos häst.

RAO

RAO är en sjukdom som i mycket liknar human astma [3]. Sjukdomen utgör ett vanligt respiratoriskt lidande hos hästar [4]. Klassiska symtom som ses är hosta, ökad andningsansträngning, mucopurulent näsflöde och abnormala lungljud [4,5]. I det typiska andningsmönstret hos drabbade hästar ses en expiratorisk fas som är förlängd och ansträngd. Hästen pressar ut luften med hjälp av buken och detta kan ge upphov till en så kallad kvickdragsfåra. Medelåldern för sjukdomsuppkomst är 9 år [4]. Reaktion mot faktorer i miljön så som dammpartiklar, endotoxiner, mögelsvampar, kvalster mm. utgör en viktig del av etiologin. De flesta hästar anses reagera på inomhusmiljön och förbättras under betesvistelse [5] men vissa hästar reagerar istället med sommarbetesassocierad sjukdom [6,7]. Att vissa individer verkar utveckla sjukdomen men andra inte trots samma hantering och miljö, gör att en genetisk predisposition misstänks [8].

Miljöåtgärder för att förhöja luftkvaliteten anses vara den del av behandling som är viktigast för att få en klinisk förbättring hos den drabbade hästen [9,10]. Medicinskt inriktas behandlingen främst på att dämpa inflammationen och att i akut fas ge bronkvidgande medel [11,12]. Sjukdomssymtomen uppträder i skov och kan framprovoceras då hästen utsätts för den miljö den är känslig för. De kliniska symtomen är alltså återkommande men sjukdomen är permanent [5]. Precis som hos humana astmatiker finns hos RAOpatienter ett brett spektrum av sensitivitet för olika antigener och stor gradskillnad i kliniska symtom [11]. De senaste 15-20 åren har man sett en minskning av antalet hästar som uppvisar en grav form av RAO med dyspné och kraftig luftvägsobstruktion. Detta kan bero på förbättrad stallmiljö för hästarna där den ökade användningen av ensilerat foder istället för hö kan vara en av faktorerna [13]. Hästar som troligen har en benägenhet att utveckla RAO men som på grund av en lägre provokation från miljön endast uppvisar en mildare form av inflammatorisk sjukdom i luftvägarna ligger i gränslandet mellan att få diagnosen RAO och IAD.

IAD

IAD är benämningen på en heterogen grupp luftvägstillstånd som primärt anses vara av ickeinfektiös natur. Kliniskt uppvisar hästen med IAD ofta nedsatt prestation och förlängd återhämtning efter arbete [14]. Symtom som även kan ses är hosta, ackumulering av sekret i trakea och näsflöde [14]. De kliniska symtomen är mindre uppenbara än hos hästen med RAO. Etiologin involverar troligen många faktorer som antingen synergistiskt eller i efterkommande följd agerar för att initiera eller förlänga luftvägsinflammationen [13]. Till skillnad från RAO drabbas i större utsträckning framför allt unga, högpresterande hästar. IAD anses vara ett vanligt fynd hos löphästar i träning [15,16]. Relationen mellan IAD hos den unga hästen och RAO är ännu ej känd. [17]

Diagnostik

Diagnostik av hästar med akuta problem av RAO är rättfram. Individerna som drabbas uppvisar tydliga kliniska tecken på sjukdom vid ett undersökningstillfälle. Vid mer subtila former av RAO eller IAD är diagnostiken mer utmanande. Framför allt de subtila förändringar som ryms inom syndromet IAD är svåra att detektera. Det finns i många fall en förvirrande brist på koppling mellan graden av strukturella förändringar av luftvägarna vid patologisk undersökning och graden av kliniska symtom [18]. I diagnostiken finns även problem med att skilja fysiologiska reaktioner från sjukliga förändringar. Ingen diagnostisk metod anses ensam utgöra "gold standard". Utredning av sjukdomsförekomst baseras istället på en sammanvägning av en rad undersökningar. De viktigaste presenteras i korthet nedan:

Anamnesticke uppgifter om stallmiljö, utfodring, hosta eller nedsatt prestation är en viktig del av utredningen.

Klinisk undersökning är grundläggande vid all sjukdomsdiagnostik. Ingen avancerad utrustning krävs. Det är billigt, lättillgängligt och kan utföras på alla patienter. Problemen som den praktiserande veterinären möter vid undersökning av

hästen med IAD rör subtiliteten i sjukdomen. Troligen uppvisar hästen inga syn- eller hörbara tecken på sjukdom. Det samma gäller hästar som har den permanenta sjukdomen RAO men som är i en fas av sjukdomen då lungan inte är provocerad till inflammation. Inga skillnader i gradering av kliniska parametrar har setts mellan friska hästar och hästar med icke-akut-RAO [11].

Den kliniska undersökningen innehåller utvärdering och gradering av ett flertal parametrar. Hästen observeras avseende respiratoriskt mönster. De tecken man letar efter rör huruvida hästen har en ökad *andningsansträngning* vilket är typiskt för en häst med akut RAO. Graden av bukpress bedöms, likaså hur mycket nosvingarna spärras ut vid utandning. Antalet andetag per minut räknas. Denna parameter får självklart bedömas med omgivningstemperatur och graden av stress i åtanke.

Lymfknutorna palperas för att se om de är förstörade eller ej. Lymfknuteförstoring är snarare indikativt för infektiös luftvägssjukdom än för RAO eller IAD.

Eventuellt *näsflöde* noteras avseende mängd, färg och viskositet. I beaktande bör man ta att hästen lätt sväljer eventuellt sekret från trakea.

Auskultation av luftstrupe och lungor är en viktig del av den kliniska undersökningen. Auskultation av lungorna med återandningspåse ger en förbättrad detektion av missljud från lungorna [19]. De ljud som noteras över lungfälten beskrivs på olika sätt av olika personer. Ökade andningsljud och detektion av missljud som ofta beskrivs som rasslande eller visslande registreras och graderas.

Hosta är ett symptom som kan tyda på både infektiös och icke infektiös sjukdom i luftvägarna, men det är ett viktigt tecken på att något inte står rätt till. Dels kan hästen uppvisa spontan hosta eller hosta vid provokation över struphuvudet.

Perkussion av lungfälten görs för att bedöma lungfältens storlek samt tätheten av lungan. Ökad täthet kan tyda på en inflammerad lunga och expansion av de bakre lungloberna visar på en svårighet vid luftens evakuering från lungan, alltså obstruktivt problem i luftvägarna.

Hur de observerade parametrarna graderas och i hur stor utsträckning förändringar anses visa på sjukdom varierar självfallet mellan bedömare. Det har inom forskarsamfundet statuerats att det finns ett behov av ett standardiserat kliniskt graderingssystem av luftvägarna för att underlätta sjukdomsdiagnostik och forskning [1].

BAL via fiberoptiskt bronkoskop har använts som diagnostisk metod för lungsjukdomar inom humanmedicinen sedan 1970-talet [21]. Metoden introducerades inom hästmedicin av Viel 1980 [21]. Icke-cellulära komponenter som histamin [22] och cytokiner [23] kan analyseras även om tyngdpunkten på analysen av vätskan ligger på typning och beräkning av celler. Vad gäller den cytologiska profilen hos hästar med IAD, karaktäriseras den av ett ökat totalantal kärnförande celler med mild neutrofil, lymfocytos och monocytos [2, 24, 25]. Hos hästar med RAO påvisas en tydlig ökning av antalet neutrofiler (>20%) tillsammans med minskat procentantal makrofager och lymfocyter [11, 21, 26]. Man har med hjälp av procenttalet neutrofiler i BAL inte lyckats skilja mellan hästar med benägenhet för RAO, men som inte befinner sig i ett sjukdomsutbrott, och normala hästar [11]. Vid studier utförda på ett stort antal installade hästar har man påvisat en cellulär profil vid BAL som stämmer överens med många forskares kriterier för IAD [27, 28, 29] Procenttalet lymfocyter som anses normal i BAL-vätskan varierar en hel del mellan hästar i

Australien, Storbritannien och US [18]. Detta leder till överlappning mellan hästgrupper i diagnostiken.

Endoskopi av luftvägarna ger möjlighet att studera strukturerna från näshåla till de medelstora luftrören. Visualisering av de övre och nedre luftvägarna via fiberendoskop har precis som BAL kommit att bli en viktig hörsten i förståelsen och diagnostiken av luftvägssjukdomar. Slem kan kontrolleras vad gäller synbart ursprung, färg och mängd. Svalg, luftsäckar, slemhinnor kan studeras. Reaktivitet i luftvägarna avseende bronkokonstriktion och hostreflex noteras. Det har gjorts en lättöverskådlig gradering av mängd och utseende av slem i trakea av Gerber et al 2004 [29]. Mittväggen mellan de två huvudbronkernas förgrening har studerats avseende trubbighet. Detta har setts som ett mått på graden av ödem i de nedre luftvägarna. I en nyligen publicerad studie har man dock sett att denna trubbighet snarare är kopplad till hästens ålder [30].

Blodprovsanalyser görs bland allt för att utesluta infektiös luftvägssjukdom.

Trakealaspirat används framförallt till bakteriologisk analys där man har hjälp i distinktionen mellan infektiös och icke-infektiös sjukdom.

Lungfunktionstester kan utföras med flera olika tekniker. Testerna används normalt inte i den vardagliga diagnostiken av luftvägssjukdomar då de kräver avancerad utrustning, måste utföras i laboratoriemiljö och utgör en stor kostnad [31]. Frånsett den forcerade expirationstekniken, som i stort bara används av ett laboratorium, så är sensitiviteten hos lungfunktionstester låg till måttlig framförallt vad gäller mindre förändringar [31].

MATERIAL OCH METODER

Retrospektiv (redan insamlad) data användes för att poängsätta luftvägsstatus hos en grupp hästar enligt 5 protokoll. Pearsonkorrelationer användes för att studera den parvisa samvariationen mellan 1) samtliga protokoll, 2) respektive protokoll och neutrofilgrad i lungsköljprov som ett objektiva mått på lunginflammation, samt 3) mellan respektive protokoll och en helhetsbedömning av luftvägshälsan som gjorts av professor Pringle och veterinär Riihimäki. Protokollen hämtades från publicerade artiklar inom det aktuella området. Ett egenutformat graderingsprotokoll ingår även i den jämförande studien.

Kliniska data

På SLU pågår forskning inom området inflammatoriska luftvägssjukdomar hos häst. Forskningen bedrivs av Professor John Pringle och Dr. Miia Riihimäki med medarbetare. Från två forskningsprojekt som denna grupp genomfört har jag sammanställt insamlade data med parametrar från klinisk undersökning, bronkoskopiundersökning samt lungsköljprover. Professor Pringle och Dr. Riihimäki har också gjort en helhetsbedömning av luftvägshälsan hos hästarna som ingått i försöken. Hästarna har bedömts i kategorierna:

i: Ingen luftvägssjukdom, ii: Inflammatorisk luftvägssjukdom, iii: Infektiös luftvägssjukdom. Bedömningen har registrerats som 0, 1 och 2 respektive.

I denna bedömning har man tagit hänsyn till anamnes, status vid allmän klinisk undersökning och vid de specialiserade undersökningarna av luftvägarna samt analysresultat från dessa. Denna bedömning använder jag som referens för att jämföra de olika graderingsprotokollens förmåga att detektera sjuka hästar.

Hästar och studieupplägg försök 1

Studien är godkänd av Djurforsöksetiska kommittén, Uppsala, (Diarenummer C 30/2).

Totalt 33 hästar undersöktes under stallperioden (februari-april). 16 av dessa hade en historia av RAO/IAD (ålder: medel 11.4 ± 1.9 SE, från 4-17 år). Sjukdom definierades som en anamnes av kronisk hosta (minst en månad före undersökningstillfället). För varje sjuk häst rekryterades en kontrollhäst av samma ålderskategori, utan symtom från luftvägarna i anamnesen ($n=15$, ålder: 11.1 i medeltal ± 1.9 SE, från 6-18 år). Ingen av hästarna i försöket hade medicinerats med kortikosteroider månaden före försöket. Anamnestiska uppgifter inkluderade bland annat detaljerad information om symtom, träningsstadium och stallmiljö.

Hästar och studieupplägg försök 2

Studien är godkänd av Djurforsöksetiska kommittén, Uppsala, (Diarenummer C 235/3)

Försök 2 var en pilotstudie där hästar och personal i ett travstall undersöktes med avseende på inflammation i lungorna kopplat till stallets luftmiljö. Tolv varmblodstravare (8, ston, 3 valacker och 1 hingst) ingick i försöket (ålder: medel 4.25 ± 1.4 SD, från 3-7år). De tolv hästarna selekterades från en grupp av 18 efter sannolikhet att de skulle stanna kvar i stallet försöksperioden ut. Undersökningar och provtagningar utfördes vid tre tillfällen, februari 2004, september 2004 och mars 2005. Tre hästar undersöktes en fjärde gång i november 2004 då de uppvisat prestationsnedsättning och misstänktes ha symtom på IAD kopplat till pulmonär eosinofili. Undersökningarna utfördes på det närliggande universitetsdjursjukhuset

Klinisk undersökning

Hästarna i båda försöken erhöll en grundlig klinisk undersökning, utökad undersökning av respirationsorganen där bl.a. lungauskultation med återandningspåse ingick, blodanalyser av vita och röda blodcellsparametrar, plasmafibrinogen, arteriell blodgasanalys samt mätning av arteriellt pH. De kliniska observationer som gjorts antecknades på ett protokoll. De parametrar som använts för att kunna översätta respektive graderingsprotokoll redovisas i tabell 1. Vad gäller perkussion av lungfält, har detta utförts endast på enstaka hästar. Undersökningsteamet ansåg att perkussionen är en mkt diffus diagnostisk metod och den har därför tagits bort från originalprotokollen.

Tabell1. Registrerade parametrar vid klinisk undersökning av luftvägarna som använts till denna studie.

Parametrar	Observerade värden
Andningsfrekvens (andetag/min)*	≤15
	16-20
	21-25
	26-30
	>30
Abdominell andning, bukpress	Normal
	Lindrigt ökad
	Måttligt ökad
	Kraftigt ökad
Submandibularlymfknotor	Ua
	Förstorade
Näsflöde	Inget
	Seröst
	Mukopurulent
Mängd näsflöde	Sparsamt
	Måttligt
	Rikligt
Näsflöde sida	Dubbelsidigt
	Enkelsidigt
Spontanhosta	Ingen
	Intermittent
	Lindrig
	Måttlig
Hostprovokation	Kraftig
	Positiv
	Negativ
Auskultation trakea	Normala ljud
	Förändrade ljud
Lungauskultation, andningsljud	Normala
	Förstärkta
	Rasslande
	Visslande
	Annat
Lungauskultation, intensitet av förändrade ljud	Lindrigt

	Måttligt
	Kraftigt
Lungauskultation, lokalisering av förändrade ljud	Dorsalt höger
	Ventral höger
	Dorsalt vänster
	Ventralt vänster
Lungauskultation med återandningspåse, Andningsljud	Normala
	Förstärkta
	Rasslande
	Visslande
	Annat
Lungauskultation med återandningspåse, intensitet av förändrade ljud	Lindrigt
	Måttligt
	Kraftigt
Lungauskultation med återandningspåse, lokalisering av förändrade ljud	Dorsalt höger
	Ventral höger
	Dorsalt vänster
	Ventralt vänster
Perkussion av lungfält	Normala
	Förändrade
	Ej utfört

* 73 % av observationerna gjordes med en exakt angivelse av andetag/min, ej angivet i intervall enligt ovan.

Endoskopiundersökning

Hästarna genomgick endoskopiundersökning av de övre och nedre luftvägarna. Inför denna sederades de med detomidin (Domosedan.vet®) i.v. och butorfanoltartrate (Torbugesic®) i.v.. Tre shetlandspannyer som ingick i försök 1 sederades istället med romifidin (Sedivet®) 0.02 mg/kg i.v.. Endoskopets längd var 180 cm och diametern 10.4 mm. Pharynx, luftsäckarna, trakea och delar av bronkträdet undersöktes och graderades i enlighet med ett protokoll som utformats av Dr Riihimäki. De parametrar som observerats vid endoskopiundersökningen, och som är relevanta för denna studie, redovisas i tabell 2.

Tabell 2. Registrerade parametrar vid endoskopiundersökning av luftvägarna som använts till denna studie.

Parameter	Observerade värden
Slemhinneutseende	Normalfärg
	Svag rodnad
	Måttligt rodnad
	Kraftigt rodnad
Bifurkationens utseende	Lindrigt ödem
	Måttligt ödem
	Kraftigt ödem
Sekret i trakea	Inget
	Klart
	Slemblandat
	Purulent
Mängd sekret i trakea	Sparsam
	Måttlig
	Riklig
Förekomst av blod vid bronkoskopi	Inget
	Sparsamt
	Måttligt
	Rikligt
Hostreflex vid Endoskopi	Normal
	Lindrigt till måttligt ökad
	Kraftigt ökad

Lungsköljprover –BAL

BAL-slangen fördes vid lungsköljning ned i ena sidans lunga med endoskopet kvar i trakea för att säkerställa korrekt placering. Via slangen injicerades 3 x 100 ml steril, isoton, kroppsvarm koksaltlösning. Återflödesvätskan placerades omgående på is och 30 ml avskiljdes direkt för preparation inför cytologisk bedömning och återstoden bereddes för realtids PCR-analys. Två olika koncentrationer av BAL-vätska, en centrifugerad och en icke-centrifugerad, användes för att tillverka lämpliga cytospinpreparat. För framställande av det ickecentrifugerade preparatet tillsattes 50 µl albuminlösning (1g bovint serumalbumin och 0,002 g NaN₃ löst i 10 ml natriumklorid) till 250 µl av BAL-vätskan. Det centrifugerade preparatet erhöles genom centrifugering av 10 ml BAL-vätska vid 400xg i 5 minuter. Cellfraktionen som återstod efter att supernatanten avlägsnats blandades upp i 50 µl albuminlösning och 100 µl från vardera lösningen, koncentrerad och ickekoncentrerad, placerades sedan i cytocentrifugkassetter. Efter torkning färgades preparaten automatiskt med

modifierad Wrightfärgning i en Hematec (Ames, Elkhart, US).

Cytologisk differentialräkning utfördes sedan från ett snittvärde av 100-200 celler av både koncentrerade och ickekoncentrerade preparat. Totalantalet celler räknades med hjälp av Cell-Dyn 3500g. Vid tekniska problem med denna utrustning utfördes räkning av totalantalet celler manuellt med räknekammare.

För att underlätta korrelationsanalys och tolkning av neutrofilantalet som ett objektiva mått på lunginflammation, har neutrofilprocenten i lungsköljproverna delats in i tre grupper.

i: <10% (normala nivåer)

ii: 10-20% (nivåer som anses i riktlinje för IAD)

iii: >20% (nivåer som ses hos hästar med RAO).

Graderingsprotokoll för inflammatoriska luftvägssjukdomar hos häst

För att hitta undersökningsprotokoll som används inom forskningen för gradering av inflammatoriska luftvägssjukdomar på häst har jag gjort en genomsökning av litteraturen på området. Jag har valt ut protokoll som använts för att gradera antingen sjukdomen IAD eller RAO (COPD eller SPA-COPD). Protokollen som jag har valt används av några av de mest aktiva forskargrupperna på området och ett par graderingsprotokoll används av flera författare. Jag har även själv utformat ett graderingsprotokoll innehållande nyckelaspekter från andra graderingsschemata samt potentiellt värdefulla kliniska parametrar från endoskopiundersökning. Även detta protokoll har analyserats för att se hur detta samvarierar med övriga och hur det stämmer med helhetsbedömningen av hästarnas luftvägshälsa.

Nedan presenteras de utvalda graderingsprotokollen för utvärdering av luftvägshälsa.

Protokoll enligt Tesarowski et al.[32]

Detta graderingsprotokoll har författaren använt i en studie av RAO-hästar där man bland annat kontrollerat förändring av kliniska variabler som orsakas av exponering för möjligt hö hos naturligt överkänsliga och kontrollhästar. Protokoll har även använts i en artikel publicerad av Couëttil et al [11]. I den första studien tittade man på kliniska symtom, utvärdering av BAL-vätska och bedömning av lungfunktion hos hästar med RAO och IAD. I försöket ingick både RAO-hästar som var i ett skov av sjukdomen samt sådana som var under återhämtning. Den andra var en studie för utvärdering av fluticasonpropionat och miljöförändringar för hästar med RAO där klinisk gradering utfördes på de sjuka hästarna före och efter behandling.

Tabell 3. Viktat graderingsprotokoll enl. Tesarowski et al[32]

Variabel	Beskrivning	Gradering
Andningsfrekvens (andetag/min)	<15	0
	16-20	1
	21-25	2
	25-29	3
	>30	4
Näsflöde	Inget	0
	Seröst	1
	Mucopurulent	3
Bukpress	Ingen	0
	Lindrig (skönjbar kvickdrags fåra)	1
	Uttalad (abdominal-, thorax- och analrörelse)	3
Vidgning av nosvingar	Ingen	0
	Finns	1
Trakeala ljud	Normala	0
	Ökad intensitet	1
	Ljud från slem i rörelse	3
Bronkiella ljud	Normala	0
	Hörbara ventrala och dorsala ljud (ökad intensitet)	2
	Rasslande lungljud	Inga
Visslande lungljud	Finns	2
	Inga	0
Hosta	Finns	2
	Ingen	0
	Intermittent	1
Lungperkussion	Paroxysmal	3
	Normala lungfält	0
	Expanderade dorsala och ventrala lungfält	2
Maximal gradering	25

Översättning/tolkning av protokollet

Översättning av andningsfrekvens utgör inget problem då graderingen är densamma som i rådatamaterialet. Att andningsfrekvens 25 i Tesarowskis protokoll förekommer i två bedömningsgrader samt att 30 inte finns medtaget kan vara en felskrivning i den

publicerade artikeln. Registrerat värde 25 har bedömts som grad 2 och registrerat värde 30 har bedömts som grad 3. Bukpress har översatts som lindrig = lindrig och måttlig och kraftig från rådatan har tolkats som uttalad enligt Tesarowski et al [32]. Nosvingarnas utspärning har inte registrerats separat i de kliniska uppgifterna från hästmaterialet. Istället har jag här ansett att nosvingarnas utspärning är kopplad till graden av bukpress och räknas som närvarande då bukpressen är måttlig och kraftig. Trakealaljud som registrerats som förändrade översätts här till förstärkta och de ljud från slem i rörelse, som beskrivs i tabellen ovan, fanns inte hos någon av hästarna enligt undersökarna. Bronkiella ljud tolkas som förstärkta, rassel och visslande ljud finns med i rådata. Den paroxysmala hostan anses motsvara kraftig hosta i rådatan. Lungperkussion hade endast genomförts på ett fåtal hästar och denna parameter bör generellt ses som att den inte tagits med i något av de jämförda protokollen.

Protokoll enligt Hare et al [22]

Hare et al har utformat detta kliniska graderingssystem för att utvärdera effekten av ett mastcellsstabiliserande läkemedel. Hästarna som ingår i studien är yngre löphästar som benämns ha symtom på 'small airway disease' vilket är i linje med diagnosen IAD.

Tabell 4. Klinisk gradering för undersökning av respirationsorganen enligt Hare et al [22]

Ansträngning vid utandning	0 -normal	1 -ökad	
Andningsfrekvens (andetag/min)	0 ≤ 12	1 12-16	2 > 16
Näsflöde	0 -inget till tunt seröst	1 - mkt rikligt seröst	2 -mucopurulent
Submandibulära lymfknutor	0 -normala	1 -förstorade	
Lungauskultation med återandningspåse	0 -normala andningsljud	1 -rassel/visslande ljud på ≤ 2 ställen	2 -rassel/visslande ljud på ≥ 2 ställen
Lungperkussion	0 -normal	1 -förändrad resonans	
Hosta	0 -ingen under undersökningen	1 -en gång under undersökningen	2 -> en gång under undersökningen
Luftvägarnas utseende vid bronkoskopi:			
Luftvägs sekretion	0 -inget	1 -muköst	2 -mucopurulent
Ödem i luftvägarna	0 -inget	1 -lindrig svullnad av carina	2 -måttlig svullnad av carina

Översättning/tolkning av protokollet

Vid översättning av andningsfrekvensen, i de fall exakta tal ej antecknats, har registreringen av ≤ 15 räknats som 1 och 16-20 som 2. Lungperkussion saknas i stort enligt ovan resonemang. Övriga parametrar är direkt översättningsbara från registreringar i ursprungsprotokollet.

Protokoll enligt Naylor et al [33]

Naylor et al 1992 har använt sig av nedanstående graderingsprotokoll för att utvärdera användbarheten av kliniska symtom, BAL och lungbiopsier som diagnostika och prognostiska hjälpmedel för att utvärdera hästar med COPD. De 18 hästar som ingår i studien har en klar klinisk bild av RAO med hosta, tackypné eller förändrade lungljud.

Tabell 5. Klinisk gradering för bedömning av RAO-hästar enligt Naylor et al [33]

	Gradering*
Andningsfrekvens (andetag/min)	
≤20	0
21-30	1
31 +	2
Ansträngning vid utandning	
Normal	0
Bukpress vid slutet av utandning	1
Utspärrade nosvingar/anal rörelse	2
Lungauskultation	
Normal	0
Lokala väsanden/knastrande ljud	1
Generaliserade väsande/knastrande ljud	2
Minskat luftflöde för andningsansträngning	
Nej	0
Ja	2

** Graderna varierar från 0 hos en normal häst till 8 i en maximalt påverkad häst*

Översättning/tolkning av protokollet

Den sista kliniska parametern som registrerats gällande då luftflödet stannar av och ger ett ökat deadspace vid andning (vilket ses hos mkt kraftigt affekterade hästar) fanns ej med i materialet från Riihimäki och Pringle [34]. Om tillståndet funnits hos någon av de undersökta hästarna skulle det enligt forskaran ha antecknats. Ingen häst i materialet led alltså av luftvägssjukdom av sådan magnitud att dessa symtom uppkom. Bedömning av nosvingar och analrörelser har tolkats som måttlig till kraftig bukpress enligt tidigare resonemang.

Protokoll enligt Rush et al [12]

Denna kliniska gradering, efter hur utspärrade nosvingar hästen har och grad av bukpress, används i liknande utformning av flera författare. Tyngdpunkten ligger alltså på andningsansträngning. Robinson [35] hänvisar till Rush et al [12] i sin artikel om relationen mellan bedömning vid kliniskgradering och lungfunktionsparametrar hos hästar med RAO. Seahorn et al. [36] använder en enkel

algoritmform som i princip motsvarar protokollet från Rush et al då han med medarbetare tittar på korrelationen mellan klinisk gradering, intrapleuralt tryck, BAL-cytologi och histopatologiska lesioner hos hästar med SPA-COPD.

Tabell 6. Klinisk graderingsystem enligt Rush et al [12]

Variabel	Grad
Utspärrade nosvingar	
Nej	1
Lindrigt, tillfälligt	2
Måttligt	3
Kraftigt	4
Bukpress	
Ingen	1
Lindrig	2
Måttlig	3
Kraftig	4

De två talen summeras. Resultatet tolkas som följer: 2 = inga symtom, 3 och 4 = lindriga symtom, 5 och 6 = måttliga symtom, 7 och 8 = kraftiga symtom.

Algoritmen enligt Seahorn et al. visas i rutan nedan.

$$\frac{\text{Medial utspärning} + \text{Lateral utspärning} + \text{Bukpress}}{2} = \text{Klinisk gradering}$$

Översättning/tolkning av protokollet

Eftersom utspärning av nosvingar inte registrerats i det sammanställda materialet har jag här valt att endast översätta detta graderingsprotokoll med registrerad gradering av bukpress. Jag anser det godtagbart som en grov tolkning då de två parametrarna enligt tidigare resonemang har bedömts registrera ansträngning vid utandning. I min översättning kommer poängen alltså bara att sträcka sig från ett till fyra.

Egenutformat graderingsprotokoll

Jag har utformat ett eget bedömningsprotokoll där jag sammanställt, graderat och viktat parametrar som jag tror speglar huruvida inflammatorisk lungsjukdom föreligger eller ej. Viktningen innebär att jag har försökt ge parametrarna olika hög poäng beroende på hur jag bedömt den potentiella biologiska signifikansen för sjukdomarna. Till exempel har andningsfrekvens i materialet getts relativt låg poäng medan hosta och onormala lungljud viktats högt. Graderingen har applicerats på materialet och jämförs och utvärderas likt de övriga.

Tabell 7. Viktat graderingsprotokoll för luftvägar enligt Hernlund.

Parameter	Observation	Gradering
Andningsfrekvens	<=15	0
	16-20	0,25
	21-25	0,5
	26-30	0,75
	>30	1
Andnings ansträngning	Ingen	0
	Lindrig	1
	Måttlig abdominell andning	3
	Kraftig bukpress, utspärrade nosvingar	4
Näsflöde art och mängd	Inget eller lindrigt seröst/muköst	0
	Måttl-kraft serös eller muköst	0,5
	Mukopurulent/färgat	1
Spontan hosta	Ingen	0
	Intermittent	2
	Lindrig	3
	Måttlig	4
	Kraftig	5
Hostprovokation	Positiv	2
	Negativ	0
Lungauskultation (ljudtyp och intensitet) med och utan återandningspåse	Normala ljud	0
	Förstärkta	0,5
	Lindrige rasslande/visslande ljud	3
	Måttliga rasslande/visslande ljud	3,5
	Kraftiga rasslande/visslande ljud	4
Sekret i trakea vid endoskopi	Inget	0
	Klart	0,5
	Slemblandat	2
	Purulent	3
Mängd sekret i trakea vid endoskopi	Sparsam	0,5
	Måttlig	2
	Riklig	3
Hostreflex vid BAL/endoskopi av luftvägarna	Normal	0
	Lindrigt till måttligt ökad	2

RESULTAT

Helhetsbedömning av luftvägsstatus

I försök 1 hade flertalet hästar från den sjuka gruppen flera fynd vid grundlig klinisk undersökning som överensstämde med diagnosen RAO. Några hästar i kontrollgruppen uppvisade lindriga respiratoriska förändringar. De kontrollhästar som vid undersökningstillfället gick på bete uppvisade däremot inga detekterbara kliniska avvikelser vid undersökning. Totalt bedömdes 12 hästar från försök 1 lida av RAO och tre hästar från försök 2 diagnosticerades med IAD vid ett undersökningstillfälle. I försök 2 fanns en häst som vid ett tillfälle bedömdes ha en infektiös luftvägssjukdom.

Korrelationsanalys

Nedan presenteras resultatet av korrelationsanalysen.

Tabell 8. Korrelationsanalys enligt Pearson (r , (p value))

	Tesarowski	Hare	Naylor	Rush	Hernlund	Neutrofil score	Helhetsbedömning
Tesarowski	1						
Hare	0,6786 ($p < 0,001$)	1					
Naylor	0,8626 ($p < 0,001$)	0,5346 ($p < 0,001$)	1				
Rush	0,7738 ($p < 0,001$)	0,5299 ($p < 0,001$)	0,7985 ($p < 0,001$)	1			
EHE	0,7243 ($p < 0,001$)	0,8505 ($p < 0,001$)	0,6306 ($p < 0,001$)	0,5692 ($p < 0,001$)	1		
Neutrofil score	0,059 ($p < 0,6278$)	0,3408 ($p < 0,0039$)	0,1246 ($p < 0,3042$)	0,0043 ($p < 0,9723$)	0,3635 ($p < 0,002$)	1	
Helhetsbedömning	0,5572 ($p < 0,001$)	0,5102 ($p < 0,001$)	0,4581 ($p < 0,001$)	0,4952 ($p < 0,001$)	0,5318 ($p < 0,001$)	0,1548 ($p < 0,2039$)	1

DISKUSSION

Det påvisas i denna jämförande studie en begränsad men likvärdig förmåga hos olika kliniska graderingsprotokoll att påvisa respiratorisk sjukdom/hälsa hos hästar med inflammatorisk luftvägssjukdom/friska hästar. I nuvarande form ger inget av de undersökta protokollen tillräcklig information för att ge den praktiserande veterinären möjlighet att efter undersökning med säkerhet avgöra huruvida en häst är drabbad av RAO eller IAD. Troligen behövs ytterligare diagnostik och fördjupad anamnestisk

kunskap för diagnosställande. En faktoranalys av respektive protokoll skulle kunna visa huruvida vissa parametrar är mer talande för sjukdomsuttryck än andra. Om sådana parametrar identifieras kan ett förbättrat graderingsprotokoll för luftvägshälsa utformas som i högre grad detekterar sjuka individer.

Den parvisa korrelationen mellan de olika protokollen uppvisar i denna studie en variation, där den starkaste ses mellan gradering enligt Tesarowski et al [32] och enligt Naylor et al [33] medan den lägsta påvisade korrelationen finns mellan ett protokoll enligt Rush et al [12] och ett enligt Hare et al [22]. Graderingsprotokollen har utformats för att detektera sjukdom hos hästar som är drabbade av olika former av sjukdom. Hares protokoll är gjort för hästar med IAD medan Naylor's designats för hästar med kliniskt manifesterad RAO. Kanske behövs olika kliniska graderingsprotokoll för att detektera IAD respektive RAO. Om den ena formen av sjuka hästar uteslöts ur analysen skulle korrelationen mellan respektive protokoll och helhetsbedömningen möjligen se annorlunda ut. Med hjälp av faktoranalys gentemot hästarna med varje form av sjukdom skulle frågan delvis kunna utredas. Fler studier med större hästmateriäl från varje sjukdomsgrupp samt fler friska hästar skulle kunna ge ytterligare svar.

Korrelationen mellan neutrofilgraderingen i BAL och helhetsbedömningen av hästarnas luftvägsstatus visar ett lågt till negligerbart värde ($p < 0,2039$). Detta är mycket intressant då procenthalten neutrofiler i BAL-vätska länge har använts som ett av de viktigaste kriterierna för inflammatorisk luftvägssjukdom. Senare års forskning pekar dock mot att procenthalten neutrofiler i BAL inte är så starkt kopplat till närvaro av inflammatorisk luftvägssjukdom som man tidigare trott [11, 27]. Couëtill påpekar i en artikel från 1999 [37] att BALF från hästar med 'small airway inflammation' (motsvarande IAD) karaktäriseras av neutrofilinflammation (även [2, 16]) men att storleken på skillnaderna är liten och dessutom överlappande med friska individer. Han poängterar att man därför bör vara försiktig vid tolkning av mindre cytologiska förändringar i BALF. Svårigheten med tolkning av den cellulära analysen vid BAL-undersökning framgår även från andra försök då man vid studier utförda på ett stort antal installerade hästar har man påvisat en cellulär profil vid BAL-undersökning som stämmer överens med många forskares kriterier för IAD [27, 28, 29]. Det verkar finnas en svårighet i tolkning av fysiologiska kontra sjukliga reaktioner och deras relation till luftmiljön. Det har diskuterats huruvida hästar (möjligen med tendens att utveckla RAO) kan ges diagnosen IAD vid en lägre provokation från luftmiljön [13]. Resultaten i denna studie lyfter frågan om hur mycket tonvikt som bör läggas vid den cellulära analysen av BAL-vätska och om gränsvärden för de olika sjukdomsformerna bör ses över.

Vid översättning av protokollen har det gjorts tolkningar i flera steg som bör ifrågasättas då resultaten av korrelationsanalysen diskuteras. Det finns dels ett led av tolkning i hur de registrerade parametrarna i rådatan har tolkats. Sedan har en översättning gjorts i ett försök att göra en "undersökning" och gradering enligt respektive författare. Det finns vissa uppenbara brister i denna översättning där notering om vissa parametrar helt saknas i rådatamaterialet och fall där graderingen är svår att översätta och tolka. Detta går att studera närmare i material och metoder

under rubriken översättning/tolkning av respektive protokoll. Det går inte att komma ifrån det faktum att slutgraderingen för varje undersökning kan skilja en hel del från om protokollutformarna själva haft möjlighet att göra undersökningen och sätta poängen. Detta förfarande kan å andra sidan ses som en fördel då studien på detta sätt blir blindad gällande de kliniska undersökningarna. De protokoll som eventuellt kommer att utformas för internationellt bruk bör dessutom kunna tillämpas av olika användare.

LITTERATURFÖRTECKNING

1. International Workshop on Equine Chronic Airway Disease Michigan State University, Recommendations for research. *Equine vet. J.* 2001; **33** (1): 5-19.
2. Rush BR. Overview of Management of Recurrent Airway Obstruction ACVIM Forum 2006.
3. Snapper JR. Large animal models of asthma. *Am Rev Respir Dis* 1986; **133**, 351-352.
4. Derksen FJ. (1987) Current therapy in equine medicine. 2. ed. St Louis MO, W.B. Saunders Company.
5. Sasse H. International Workshop on Equine Chronic Airway Disease Michigan State University, *Equine vet. J.* 2001; **33** (1): 5-19.
6. Seahorn, TL and Beadle RE. Summer pasture-associated obstructive pulmonary disease in horses: 21 cases (1983-1991) *J. Am. Vet. Med. Ass.* 1993; **202**, 779-782.
7. Seahorn, TL, et al. Chronic obstructive pulmonary disease in horses in Louisiana. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 1996; **208**, 248-251.
8. Ewart SL, Robinson NE. Genes and respiratory disease: a first step on a long journey. *Equine Vet. J.* 2007; **39**(3) 270-274.
9. Couëtil LL et al. Randomized, controlled study of inhaled fluticasone propionate, oral administration of prednisone, and environmental management of horses with recurrent airway obstruction. *Am J Vet Res.* 2005; **66**(10), 1665-74.
10. Jackson CA et al. Environment and prednisone interactions in the treatment of recurrent airway obstruction (heaves). *Equine Vet J.* 2000; **32**(5): 432-8.
11. Couëtil LL et al. Clinical signs, evaluation of bronchoalveolar lavage fluid, and assessment of pulmonary function in horses with inflammatory respiratory disease *Am J Vet Res.* 2001; **62** (4): 538-546.
12. Rush BR et al. Pulmonary function in horses with recurrent airway obstruction after aerosol and parenteral administration of beclomethasone dipropionate and dexamethasone, respectively. *Am J Vet Res.* 1998; **59**(8): 1039-43.
13. Dixon et al. European clinician's perspective. A Proceedings of a Workshop on Inflammatory Airway Disease: Defining the syndrome. (2003) (Newmarket) Suffolk, R & W Publications. FD 12
14. Rush BR. Inflammatory airway disease: a clinician's view from North America A Proceedings of a Workshop on Inflammatory Airway Disease: Defining the syndrome. (2003) (Newmarket) Suffolk, R & W Publications.
15. Burrell et al. Respiratory disease in thoroughbred horses in training: the relationships between disease and viruses, bacteria and environment. *Vet Rec.* 1996 28; **139**(13):308-13.

16. Moore BR et al. Cytologic evaluation of bronchoalveolar lavage fluid obtained from standardbred racehorses with inflammatory airway disease. *Am J Vet Res.* 1995; **56**(5): 562-7.
17. Robinson E, Hoffman A. Editors' foreword. *Proceedings of a Workshop on Inflammatory Airway Disease: Defining the syndrome.* (2003) (Newmarket) Suffolk, R & W Publications.
18. Slocombe. *International Workshop on Equine Chronic Airway Disease Michigan State University, Equine vet. J.* 2001; **33** (1): 5-19.
19. Naylor JM, Clark EG, Clayton HM. Chronic obstructive pulmonary disease: Usefulness of clinical signs, bronchoalveolar lavage, and lung biopsy as diagnostic and prognostic aids. *Can Vet J.* 1992; **33**(9): 591-598.
20. Vrins A, Doucet M, Nunez-Ochoa L. A retrospective study of bronchoalveolar lavage cytology in horses with clinical findings of small airway disease. *Zentralbl Veterinarmed A.* 1991; **38**(6):472-9.
21. Derksen FJ et al. Bronchoalveolar lavage in ponies with recurrent airway obstruction (heaves). *Am Rev Respir Dis.* 1985; **132**(5): 1066-70.
22. Hare JE et al. Effect of sodium cromoglycate on light racehorses with elevated metachromatic cell numbers on bronchoalveolar lavage and reduced exercise tolerance. *J Vet Pharmacol Ther.* 1994; **17**(3): 237-44.
23. Franchini M et al. The role of neutrophil chemotactic cytokines in the pathogenesis of equine chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Vet Immunol Immunopathol.* 1998 **6**; **66**(1): 53-65.
24. Fogarty U, Buckley T. Bronchoalveolar lavage findings in horses with exercise intolerance. *Equine Vet J.* 1991; **23**(6): 434-7.
25. Hoffman AM, Mazan MR, Ellenberg S. Association between bronchoalveolar lavage cytologic features and airway reactivity in horses with a history of exercise intolerance. *Am J Vet Res.* 1998; **59**(2): 176-81.
26. Mair TS, Stokes CR, Bourne FJ. Cellular content of secretions obtained by lavage from different levels of the equine respiratory tract. *Equine Vet J.* 1987; **19**(5): 458-62.
27. Holcombe SJ, et al. Stabling is associated with airway inflammation in young Arabian horses *Equine vet. J.* 2001; **33** (3): 244-249.
28. Tremblay GM et al. Effect of stabling on bronchoalveolar cells obtained from normal and COPD horses. *Equine Vet J.* 1993; **25**(3): 194-7.
29. Gerber V et al. Airway mucus in recurrent airway obstruction-short-term response to environmental challenge. *J Vet Intern Med.* 2004 Jan-Feb; **18**(1): 92-7.
30. Koch C et al. Endoscopic scoring of the tracheal septum in horses and its clinical relevance for the evaluation of lower airway health in horses. *Equine vet. J.* 2007; **39** (2): 107-112.
31. Hoffman A. Newest Diagnostic Methods for Inflammatory Airway Disease (IAD). *Am. Ass. Equine Pract. Proc.* 2002a; **48**, 208-217.
32. Tesarowski DB, Viel L, McDonnell WN. Pulmonary function measurements during repeated environmental challenge of horses with recurrent airway obstruction (heaves). *Am J Vet Res.* 1996; **57**(8): 1214-9.

33. Naylor JM, Clark EG, Clayton HM. Chronic obstructive pulmonary disease: Usefulness of clinical signs, bronchoalveolar lavage, and lung biopsy as diagnostic and prognostic aids. *Can Vet J.* 1992; **33**(9): 591-598.
34. Riihimäki M et al. 2008. Markers of respiratory inflammation in horses in relation to seasonal changes in air quality in a conventional racing stable. Doctoral thesis No. 2008:12, Swedish University of Agricultural Sciences. ISBN 978-91-85913-45-9
35. Robinson NE et al. Relationship between clinical signs and lung function in horses with recurrent airway obstruction (heaves) during a bronchodilator trial. *Equine Vet J.* 2000; **32**(5): 393-400.
36. Seahorn TL et al. Quantification of antigen-specific antibody concentrations in tracheal lavage fluid of horses with summer pasture-associated obstructive pulmonary disease. *Am J Vet Res.* 1997; **58**(12): 1408-11.
37. Couëtil LL, Denicola DB. Blood gas, plasma lactate and bronchoalveolar lavage cytology analyses in racehorses with respiratory disease. *Equine Vet J Suppl.* 1999; **30**: 77-82.