


Alt Solunum Sistemi Hastalığına Sahip Taylarda Bronkoalveolar Lavaj Sıvısının Bakteriolojik ve Sitolojik Değerlendirilmesi

Sevim KASAP¹ Hüban GÖÇMEN² Serkan ÇATIK¹ Kaan ONAT³
Mihriban ÜLGEN³ Cengiz ÇETİN³ Engin KENNERMAN¹ 

¹ Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Uludag University, TR-16059 Bursa - TURKEY

² Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Near East University, Nicosia - TRNC

³ Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Uludag University, TR-16059 Bursa - TURKEY

Article Code: KVFD-2014-12502 Received: 27.10.2014 Accepted: 23.01.2015 Published Online: 06.02.2015

Özet

Taylarda alt solunum sistemi hastalıkları at yetiştiriciliğinde ekonomik kayıpların başında gelmektedir. Bu hastalıkta etkenin kesin tanısı için kullanılan birçok yöntem bulunmaktadır. Bronkoalveolar lavaj, hem bakteriyel hem de sitolojik muayenenin yapılabilmesi açısından en önemli tekniklerden biridir. Bu çalışmada, alt solunum sistemi hastalığı olan taylarda BAL örneklerinin sitolojik ve bakteriolojik muayene bulgularının değerlendirilmesi amaçlandı. BAL örneklerinin sitolojik muayenelerine göre etken üreyen olgularda etken üremeyen olgulara göre nötrofil, makrofaj ($P<0.001$) ve lenfosit hücrelerinin ($P<0.05$) yüzde oranları arasında istatistiki olarak önem bulundu. Ayrıca alınan BAL sıvısından yapılan bakteriolojik muayene sonucunda 20 tayda, *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (10), *Staphylococcus aureus* (7), *Escherichia coli* (3), etkenleri çoğunlukta olmak üzere toplamda 25 adet aerobik/fakültatik gram (+) kok ve gram (-) basil grubunda bakteri üremesi tespit edildi. Sonuç olarak, alt solunum yolları hastalıklarında, özellikle endoskopi eşliğinde yapılan BAL tekniğinin gerek sitolojik değerlendirme, gerekse bakteriolojik muayene amacıyla uygulanmasının tanı ve tedavi protokolünün oluşturulması açısından büyük önem taşıdığı sonucuna varıldı.

Anahtar sözcükler: Alt solunum yolları hastalığı, Bakteriolojik muayene, Sitolojik muayene, Bronkoalveolar lavaj tekniği, Tay

Bacteriological and Cytological Findings of Bronchoalveolar Lavage Fluids in Foals with Lower Respiratory Tract Diseases

Abstract

Lower respiratory tract disease is one of the most common causes of economic loss in foals. There are several methods used for the diagnosis of this disease. Bronchoalveolar lavage is one of the most important technique for bacteriological and cytological examination. The aim of this study was to evaluate BAL samples' cytologic and bacteriologic examination of foals with lower respiratory tract disease. In the comparison of cytologic examination of BAL samples with bacterial agents and without bacterial agents statistical differences in the percentage of neutrophils, macrophages ($P<0.001$) and lymphocytes ($P<0.05$) were defined. Also according to the bacteriologic examination results of the BAL samples in 20 foals following agents were mainly detected: *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (10), *Staphylococcus aureus* (7), *Escherichia coli* (3). Totally 25 aerobic/facultative gram (+) and gram (-) bacils were isolated. In conclusion, the BAL technic is useful for cytological and bacteriological examination in horses with lower respiratory tract diseases.

Keywords: Lower respiratory tract disease, Bacteriological examination, Cytological examination, Bronchoalveolar lavage, Foal

GİRİŞ

Solunum yolları hastalığı yarış atlarında kas iskelet sisteminden sonra zayıf performansa sebep olan en çok karşılaşılan hastalıklar grubundan olduğu^[1], özellikle taylarda önemli ekonomik kayıplara neden olduğu da ayrıca

belirtilmektedir^[2]. Yapılan çalışmalar alt solunum yolları hastalıklarına neden olan birçok dispozisyon faktörlerin olduğunu göstermektedir. Bunlar arasında viral, bakteriyel, paraziter etkenler gibi enfektif faktörlerin yanı sıra, mevsimsel faktörler, stres, ventilasyon, barınak koşulları gibi çevresel faktörler de yer almaktadır^[3,4].



İletişim (Correspondence)



+90 224 2941207



engink@uludag.edu.tr

Akciğerlerde, normal koşullarda klirens (mukosilier transport) mekanizması ile patojen bakteriler uzaklaştırılarak etkisiz hale getirilmektedirler fakat akciğer savunma mekanizmasında oluşan aksaklıklarla birlikte orofarenks bölgesinden aspire edilmiş olan bakteriler ilerleyerek çoğalırlar ve bunun sonucunda pnömoni oluşturdıkları bilinmektedir [5]. Atlarda ve taylarda alt solunum yollarının hastalıklarında birçok etken izole edilmekle birlikte, bunların içerisinde bazı etkenler sıklıkla saptanmaktadır. Örneğin streptococcal pnömoniler ya da *Rhodococcus equi* enfeksiyonları tek başlarına çok ciddi enfeksiyonlar oluşturabilmektedir [6,7]. Atlarda alt solunum yolları hastalıklarında birçok etken izole edilmekle birlikte bunların içerisinde bazı etkenlere daha sık rastlanmaktadır. *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (β -hemolitik), *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus pneumoniae* (α -hemolitik) en sık izole edilen gram (+) bakteri türleri iken, en sık izole edilen gram (-) bakteriler ise *Pasteurella*, *Actinobacillus* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica* ve *Enterobacter* spp.'dir [2,4,8-16]. Bu etkenler tek başlarına hastalık oluşturmamakla birlikte mik enfeksiyonlara da neden olabilmektedir [11,17-20].

Hastaların anamnez bilgileri çok dikkatli alınmalı daha önce aynı şikayeti geçirip geçirmediği, tedavi uygulanıp uygulanmadığı, uygulandı ise kullanılan ilaçlar ve tedavi zamanı ile ilgili bilgiler alınmalıdır. Pnömoni şekillenen taylarda dikkatli bir şekilde klinik ve hematolojik değerlendirme yapılarak; özellikle, öksürük, burun akıntısı, vücut sıcaklığında artış, toraksın oskültasyon ve perküsyonunda anormal sesler değerlendirilmelidir. Solunum sistemi problemi olan atlarda hematolojik muayene enfektif problemlerle non-enfektif problemleri birbirinden ayırt etmede yardımcı olabilir. Bununla birlikte non-enfektif yangısal hastalıklarda ve stres durumlarında da hematolojik tabloda değişimler olabileceği unutulmamalıdır [21].

Atlarda alt solunum yolu hastalarına tanısal yaklaşımda, torasik oskültasyon, endoskopik muayene, BAL ve toraks radyografisi kullanılan tekniklerdir [22]. Günümüzde, at hastanelerinde ve bazı kliniklerde atların alt solunum yolu hastalıklarında kullanılan tanı yöntemi endoskopik muayenedir. Uygulaması diğer metodlara göre ekonomik olup, saha şartlarında kullanımı da diğer tanı metodlarına göre daha pratiktir. Endoskopik muayene dışında yapılan BAL tekniği de hastalığın seyri ve tedavisi için sık kullanılan yöntemler arasındadır. Alınan örneklerin bakteriyolojik ve sitolojik değerlendirmesi [22] tedavi protokolü oluşturulmasına yardımcı olmaktadır. BAL yöntemi ile alınan örneklerin sitolojik muayenesinde, solunum yollarının farklı anatomik bölgelerine ait hücreler ile yangı hücreleri değerlendirilerek, yangının şiddeti daha net anlaşılmaktadır [22,23].

Bu çalışmada, alt solunum sistemi hastalığı olan taylarda BAL örneklerinin sitolojik ve bakteriyolojik muayene bulgularının değerlendirilmesi amaçlandı.

MATERYAL ve METOT

Çalışma Materyali

Çalışmanın materyali olarak, Mayıs-Ağustos 2013 ayları arasında hayvan hastanemize getirilen solunum sistemi sorunları olan, farklı yaş (2-6 ay) ve canlı ağırlıklardaki (50-100 kg) 20 adet İngiliz ırkı tayı kullanıldı. Taylar, düzenli olarak havalandırılan, birbiriyle bağlantısı olmayan ayrı padoklarda barındırılmakta, altlık olarak ince kıyılmış saman veya talaş kullanılmaktaydı. Hayvanlar serbest olarak su tüketimi imkânıyla birlikte ihtiyaçlarına göre özel olarak oluşturulan rasyonlarla beslenilmekteydi.

Endoskopik Muayene ve BAL Sıvı Örneklerinin Alınması

Endoskopi uygulamasının rahat yapılabilmesi için öncelikle taylar, üst dudak bölgelerine yavaşça uygulanarak zaptı rapta alındı. Endoskopik muayenede ilk olarak üst solunum yollarına (burun boşluğu, hava keseleri, farenks) ilişkin anatomik bölgeler muayene edilerek anormal bulgular not edildi. Üst solunum yollarının detaylı muayenesinden sonra alt solunum yollarına ilişkin muayeneler de yapılarak, elde edilen bulgular kayıt edildi. Sadece üst solunum yollarına ilişkin problemi olup alt solunum yollarına ilişkin problemi olmayan taylar belirlenerek çalışmaya dahil edilmedi. Endoskopi için 3 m uzunluğunda ve 9.9 mm çapında olan endoskop ile (vet-vu) burun boşluğundan ilerleyerek farenkse ve daha sonrada rima glottis'te ilerleterek trakeaya girildi. BAL steril katateri ile endoskopun çalışma kanalından 60 ml steril %0.9'luk izotonik NaCl solüsyonu verildi ve kısa bir süre sonra solüsyon steril enjektörlerle aspire edilerek bronchoalveolar lavaj uygulandı. En son olarak BAL sıvısı steril tüplere alındı. Alınan örnekler aynı gün analiz edilmek üzere 30 dak. içerisinde laboratuvara ulaştırıldı. Mikrobiyolojik analiz için birkaç gün bekletilmesi gereken örnekler ise -20°C'de muhafaza edildi. Sitolojik muayene için ayrılan BAL sıvısından aynı gün içerisinde froti hazırlandı.

Mikrobiyolojik Analiz

Soğuk zincirde laboratuvarımıza ulaştırılan BAL örneklerinin dikkatli bir şekilde genel, selektif ve diferensiyel besiyerlerine separe ekimleri yapıldı. Bakteriyel izolasyonlar için genel besiyeri olarak Kanlı Agar, Tryptic Soy Agar (T.S.A.), diferansiyel besi yeri olarak MacConkey Agar (M.C.) ve Eozin Metilen Blue Agar (E.M.B.) ve selektif besiyeri olarak Caz-N.B. Agar, Chocolate Agar, Edward's besiyerleri kullanıldı. Mantar izolasyonu için ise Saboraud Dekstroz Agar (S.D.A.)'a ekim yapıldı. Tüm ekimler optimal sürede ve 37°C'de etüvde bekletildi. Üreyen kolonilerden Gram boyama yapıldı. Saf kültürler hazırlanarak rutin biyokimyasal testler ile identifikasyon yapıldı.

Sitolojik Analiz

BAL örneklerinden froti hazırlamak amacıyla ilk olarak

dilue edilmemiş örnekler santrifüj edildi (Nüve HN075). Çekilen frotiler kurutulduktan sonra Wright-Giemsa boyası [GBL HEMADİFF (Wright's eosin methylene blue solution), MERCK (Giemsa's azur eosin methylene blue solution)] ile boyandı. Hazırlanan frotiler kurutulduktan sonra üzerine immersiyon yağı damlatılarak, mikroskopun (OLYMPUS cover-015) 100'lük objektifi ile incelendi. Yangı hücrelerini de içeren formül lökosit sayımında frotilerin farklı bölgeleri incelenerek 100 adet hücre sayımı yapıldı. Daha sonra çıkan hücrelerin yüzde oranları belirlendi.

İstatistiksel Analiz

Varyansların homojenliği test edilerek, etken üreyen ve etken üremeyen grupların karşılaştırılmasında t-testi (independent samples t-test) uygulandı. Önemlilik düzeyi olarak $P \leq 0.05$ seçildi. İstatistik analizler S.P.S.S. 13 istatistik programından yararlanılarak yapıldı.

BULGULAR

Endoskopik Muayene Bulguları

Yapılan endoskopik muayenede bazı hayvanlarda farenks bölgesinde hiperemik ve ödematöz mukoza varlığı belirlendi. Özellikle öksüren hayvanlarda trakeal lümenin hiperemik olduğu saptandı. Çalışmayı oluşturan bütün olgularda; özellikle trakeanın karina bölgesinde mukoid ya da purulent karakterde akıntının mevcut olduğu belirlendi. Bu bulgular doğrultusunda: olguların 4'ünde (%20) üst solunum yollarına ilişkin bulgular, 13'ünde (%65) trakeada hiperemi bulgusu, 30'unda (%18) mukoid akıntı, 14'ünde (%70) purulent akıntı ve 2'sinde (%10) ödem tablosuna rastlanıldı.

Mikrobiyolojik Muayene Bulguları

Yapılan mikrobiyolojik muayenede, *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus* (10), *Staphylococcus aureus* (7), *Escherichia coli* (3), bakterileri izole edildi. Bunların dışında bazı olgularda *Aspergillus fumigatus*, *Candida spp.* etkenleri de saptandı. Yapılan analiz sonucunda 7 hayvanın BAL sıvısında üreme tespit edilmedi. Hastalardan 3 tanesinde 3, 5 tanesinde 2, 5 tanesinde 1. mikrobiyolojik analiz sonucunda üreyen etkenlerin izolasyon oranları *Tablo 1*'de belirtilmiştir.

Sitolojik Muayene Bulguları

Yapılan mikrobiyolojik muayene sonucunda bakteri saptanan örneklerde hücre morfolojileri genel anlamda irdelendiğinde makrofajların oldukça büyük olduğu ve vakuolizasyon şekillendiği, büyük çoğunlukla reaktif lenfositlerin ve nötrofillerin tabloya egemen olduğu belirlendi. Yine bu örneklerin bazılarında daha önceki bir kanamanın varlığını işaret eden hemosiderinlere ve bakteri izole edilen olgularda bakteri kümeleri saptandı.

Fungal etkenlerin saptandığı örneklerde ise genel

Tablo 1. Bakteriolojik değerlendirmede üreme görülen 13 tayda izole edilen bakteri türleri

Table 1. Bacterial specimens isolated from 13 culture positive foals in bacteriological evaluation

Aerobik/FA Bakteri	Bakteri Sayısı (n)
Aerobik/FA Gram (+) Kok	
<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	7
<i>Streptococcus pyogenes</i>	2
<i>Rhodococcus equi</i>	1
Aerobik/FA Gram (-) Basil	
<i>Escherichia coli</i>	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
Toplam izole edilen aerobik/FA bakteri sayısı	25

Tablo 2. Etken üreyen ve etken üremeyen olgulardaki sitolojik örneklerle ait lökositler bulguların % değerlerinin karşılaştırılması

Table 2. Comparison of bacterial isolated and non-bacterial isolated cases about the percentage of leukocytes in cytological samples

Lökositler	Etken Üreyen (n=13) Ort. Değer± SE	Etken Üremeyen (n=7) Ort. Değer± SE
Nötrofil (%)	42.23±1.9*	13.29±0.83*
Lenfosit (%)	16.61±2.85**	24±2.72**
Eozinofil (%)	0.84±0.33	1.71±1.08
Makrofaj (%)	39.84±2.79*	60.14±2.97*
Mast (%)	0.46±0.46	0.85±0.7

* Etken üreyen ve etken üremeyen olgulardaki sitolojik örneklerle ait lökositler bulguların % değerleri arasındaki $P < 0.05$ ve ** $P < 0.001$ düzeyindeki farkı ifade eder

olarak hücre morfolojilerinde herhangi bir anormallik saptanmadı.

Frotiler muayenesinde hücre oranları hesaplandıktan sonra etken üreyen ile etken üremeyen örneklerin lökositler hücre yoğunlukları istatistiksel yönden anlamlılığı (*Tablo 2*) karşılaştırıldı.

TARTIŞMA ve SONUÇ

At yetiştiriciliğinde, solunum sistemine ilişkin hastalıkların dünya genelinde en sık karşılaşılan hastalıklar arasında olduğu belirtilmektedir [24,25]. Solunum sistemi hastalıklarının oluşmasında barınak koşulları ve mevsim şartları önemli yere sahiptir. Kalabalık ortamda bulunan atların, bakteriyel ve viral solunum patojenlerine maruz kalma olasılığı daha yüksektir [21]. Solunum sistemi hastalıklarına predispozisyon hazırlayan önemli çevresel faktörler arasında saman üzerindeki mantar sporları, mikotoksinler, yataklık ve havadaki amonyak seviyesi, izolasyon, güneş ışığı ve ventilasyon sayılabilir [3,4]. Başarılı çevresel kontrol ve barınak koşullarının iyileştirilmesi solunum sistemi hastalıklarının önlenmesi açısından önemli rol oynamaktadır. Sunulan çalışmada taylar kendi bireysel padoklarında

barınmasına karşın altlık olarak ince kıyılmış saman veya talaş kullanılması, daha fazla tozlanmaya neden olarak solunum sistemi hastalıklarının oluşmasına predispoze bir faktör olarak rol oynadığı düşünülmektedir.

Atlarda ve taylarda alt solunum yolları hastalıklarında en sık başvurulan yöntemlerden biri de BAL tekniğidir. Özellikle kronik solunum sistemi hastalıklarında tercih edilse de gerek bakteriyolojik gerekse sitolojik muayene açısından değerlendirmede önemli bir rolü bulunmaktadır [15,26-33]. Diğer bir tanı yöntemi olan trakeal aspirasyon tekniği de alt solunum yolları hastalıklarında sıklıkla kullanılan yöntemlerdendir fakat BAL ile karşılaştırıldığında aralarında birçok farklılık bulunmaktadır [34,35]. Öncelikle trakeal aspirasyon yönteminde kullanılan %0.9 İzotonik NaCl solüsyonunun miktarı BAL yöntemine göre daha az miktardadır [35]. Yapılan çalışmalarda iki tekniğin karşılaştırılmalı olarak yapılan sitolojik değerlendirmelerinde BAL tekniği ile alınan örneklerin anatomik konumunun değişik olmasından kaynaklanan farklılıklar bulunmaktadır [34,35]. Ayrıca trakeal aspirasyon yöntemi saha şartlarında daha pratik ve daha ekonomik bir yöntem olsa da tanısal açıdan BAL muayenesi sitolojik ve bakteriyolojik açıdan daha detaylı bilgi verdiği yapılan diğer çalışmalarda belirtilmiştir [36,37]. Yapılan bu çalışmada BAL tekniği ile alınan sıvının bakteriyolojik ve sitolojik değerlendirmesi hastalığın tedavi ve seyrini olumlu yönde etkilemiş ve yapılan diğer çalışmalar ile paralellik gösterdiği görülmüştür.

Atların ve tayların solunum sistemi hastalıkları kompleks içerisinde yapılan çalışmalarda trakeabronşial aspirasyon (TBA) ve BAL teknikleri ile alınan örneklerde birçok etken identifiye edilmiştir [2,15,31,37-39]. *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus* (β- hemolitik), *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus pneumoniae* (α-hemolitik) en sık karşılaşılan gram pozitif bakteri türleri iken, en sık izole edilen gram negatif bakteri türleri ise *Pasteurella*, *Aktinobasillus* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica* ve *Enterobacter* spp.'dir [2,4,8-16,31]. *Pseudomonas* türleri ise atlarda karşılaşılan pnömonilerde etkili bir patojen değildir. Bu etken çoğunlukla trakeabronşial aspirasyon sırasında endoskop gibi ekipmanlar ile kontaminasyon sonucu izole edilir. Bu etkenler arasında *Str. zooepidemicus* en sık izole edilen bakteri olarak tanımlanmıştır [38-40]. Hoffman ve ark.'nın [31] taylarda yapmış oldukları bir çalışmada BAL tekniği kullanılarak alınan sıvı örneğinde *Streptococcus zooepidemicus* etkeninin en çok üreyen ikinci bakteri türü olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, Laus ve ark.'nın [40] *Streptococcus zooepidemicus* ve *Streptococcus pneumoniae* etkenlerinin neden olduğu yarı solunum sistemi hastalıklarının yaşı ilerledikçe görülme oranının azaldığını belirtmektedirler. Bu çalışmada da *Streptococcus zooepidemicus* izole edilen atlarda yaş dağılımı incelendiğinde 10 atın da yaş aralığının 4-5 yaş arasında olması bu veriler ile uygunluk göstermektedir.

Sağlıklı atların BAL sıvısı sitolojisinde nötrofil oranının

%0-17 arasında olduğu bildirilmiştir [41]. Alt solunum yolu hastalıklarında BAL sıvısı sitolojisi ile histopatoloji bulguları arasında yüksek bir korelasyon olması nedeniyle transtracheal aspirasyon sitolojisinden daha fazla tercih edilmektedir [26]. Hastalık süresince BAL sıvısında nötrofil ve makrofaj oranlarında değişen derecelerde (%20-90 nötrofil) artış gözlenmektedir [26,41]. Hoffman ve ark.'nın [15] taylarda yapmış oldukları bir çalışmada nötrofil oranlarının bakteriyel üreme ile doğru orantılı olarak arttığı belirtilmiştir. Bu çalışmada bakteri izolasyonu yapılan olguların sitolojik örneklerinde bakteri izole edilmeyen olgulardaki sitolojik örnekler göre nötrofil yüzdesinin fazla olması bu görüşü desteklemektedir (P<0.001). Ayrıca, sitolojik değerlendirmede nötrofil oranının fazla olması, bakteriyel enfeksiyon varlığını da destekler niteliktedir. Bu çalışmada solunum sistemi şikayeti olan 20 olgunun 17'sinde etken izolasyonu yapılarak olguların %85'inde neden ortaya konmuştur.

Sonuç olarak, öksürük ve burun akıntısı şikayeti ile gelen taylara uygulanan endoskopik muayenede alt solunum sistemine ait bulguları olan 20 adet tay çalışmaya alındı. Bu bulgular doğrultusunda: olguların 4'ünde (%20) üst solunum yollarına ilişkin bulgular, 13'ünde (%65) trakeada hiperemi bulgusu, 30'unda (%18) mukoid akıntı, 14'ünde (%70) purulent akıntı ve 2'sinde (%10) ödem tablosuna rastlanıldı. Taylara sırasıyla klinik ve BAL sıvısının sitolojik ve bakteriyolojik muayenesi yapıldı. Çalışmada, bakteri izole edilen BAL sıvısı örneklerin sitolojik değerlendirmelerinde, bakteri izole edilmeyenlere göre belirgin bir fark olması tanı aşamasında sitolojik değerlendirmenin önemini vurgulamaktadır. Çalışmanın sonunda endoskopi eşliğinde uygulanan BAL tekniğinin taylarda alt solunum sistemi hastalıklarının tanısal yaklaşımında gerek etken identifikasyonu açısından gerekse sitolojik değerlendirme açısından önemli ve faydalı olduğu saptanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Rossdale PD, Hopes R, Wingfield Digby NJ, Offord K: Epidemiological study of wastage among racehorses 1982 and 1983. *Vet Rec*, 116, 66-69, 1985. DOI: 10.1136/vr.116.3.66
2. Hoffman AM, Viel L, Muckie CA, Tesarowski DB: Evaluation of a guarded bronchoscopic method for microbial sampling of lower airways in foals. *Can J Vet Res*, 55, 325-331, 1991.
3. Wood JLN, Newton JR, Smith KC, Marlin DC: Aetiological agents: Viruses and inflammatory airway disease. In, Hoffman AM, Robinson NE, Wade JF (Eds): *Inflammatory Airway Disease: Defining the Syndrome*, 33-36, R&W Publications (Newmarket) Ltd., Boston, Mass, 2003.
4. Newton JR, Wood JL, Chanter N: A case control study of factors and infections associated with clinically apparent respiratory disease in UK thoroughbred racehorses. *Prev Vet Med*, 60, 107-132, 2003. DOI: 10.1016/S0167-5877(03)00085-0
5. Ainsworth DM, Cheetham J: Disorders of the respiratory disease. In, Reed SM, Bayly WM, Sellon DC (Eds): *Equine Internal Medicine*. 3rd ed., 290-371, Saunders-Elsevier, St. Louis, 2010.
6. Rush B, Mair T: *Equine Respiratory Diseases*. Blackwell Publishing Co., Oxford, 2004.
7. Lèguillette R, Roy MF, Lavoie JP: Foal pneumonia. In, Lekeux P (Ed): *Equine Respiratory Diseases*. International Veterinary Information

Service, Ithaca, New York, USA.

8. **Chapman PS, Green C, Main CP, Taylor PM, Cunningham FM, Cook AJ, Marr CM:** Retrospective study of the relationships between age, inflammation and the isolation of bacteria from the lower respiratory tract of thoroughbred horses. *Vet Rec*, 146, 91-95, 2000.
9. **Christley RM, Hodgson DR, Rose RJ, Wood JLN, Reid SWJ, Whitear Gg, Hodgson JL:** A case-control study of respiratory disease in thoroughbred racehorses in Sydney, Australia. *Equine Vet J*, 33, 256-264, 2001. DOI: 10.2746/042516401776249796
10. **Davis EG, Freeman DE, Hardy J:** Respiratory infections. In, Sellon DC, Long MT (Eds): *Equine Infectious Diseases*. 1-7, Saunders Elsevier, Philadelphia, 2007.
11. **Debroy C, Roberts E, Jayarao BM, Brooks JW:** Bronchopneumonia associated with extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in a horse. *J Vet Diagn Invest*, 20, 661-664, 2008. DOI: 10.1177/104063870802000524
12. **Racklyeft DJ, Love DN:** Bacterial infection of the lower respiratory tract in 34 horses. *Aust Vet J*, 78, 549-559, 2000. DOI: 10.1111/j.1751-0813.2000.tb11901.x
13. **Sweeney CR, Holcombe SJ, Barningham SC, Beech J:** Aerobic and anaerobic bacterial isolates from horses with pneumonia or pleuropneumonia and antimicrobial susceptibility patterns of the aerobes. *J Am Vet Med Assoc*, 198, 839-842, 1991.
14. **Wilson WD:** Foal pneumonia: An overview. *Proc Am Assoc Equine Pract*, 38, 203-229, 1992.
15. **Hoffman AM, Viel L, Prescott JF:** Association of microbiologic flora with clinical, endoscopic, and pulmonary cytologic findings in foals with distal respiratory tract infection. *Am J Vet Res*, 54 (10): 1615-1622, 1993.
16. **Lavoie JP, Couture L, Higgins R, Laverty S:** Aerobic bacterial isolates in horses in a university hospital, 1986-1988. *Can Vet J*, 32, 292-294, 1991.
17. **Newton JR, Wood JLN:** Summary of a case control study of acute respiratory disease in young Thoroughbred racehorses. In, *Proceedings of British Equine Veterinary Association Congress*, 12-15 September, England, 38, 190-191, 1999.
18. **Medica P, Giacoppo E, Fazio E, Aveni F, Pellizzotto R, Ferlazzo A:** Cortisol and haematochemical variables of horses during a two day trekking event: Effects of preliminary transport. *Equine Vet J*, 38, 167-170, 2010. DOI: 10.1111/j.2042-3306.2010.00197.x
19. **Stull CL, Rodiek AV:** Physiological responses of horses to 24 hours of transportation using a commercial van during summer conditions. *J Anim Sci*, 78, 1458-1466, 2000.
20. **Schmidt A, Hodl S, Mostl E, Aurich J, Muller J, Aurich C:** Cortisol release, heart rate, and heart rate variability in transport-naïve horses during repeated road transport. *Domest Anim Endocrinol*, 39, 205-213, 2010. DOI: 10.1016/j.domaniend.2010.06.002
21. **Roy MF, Lavoie JP:** Tools for the diagnosis of equine respiratory disorders. *Equine Vet Clin*, 19, 1-17, 2003. DOI: 10.1016/S0749-0739(02)00063-9
22. **Moore BR:** Lower respiratory tract disease. *Vet Clin North Am: Equine Pract*, 12, 457-472, 1996.
23. **Robinson NE:** Inflammatory airway disease: Defining the syndrome. Conclusions of the Havemeyer Workshop. *Equine Vet Edu*, 15, 61-63, 2003. DOI: 10.1111/j.2042-3292.2003.tb00216.x
24. **Rossdale PD, Hopes R, Wingfield Digby NJ, Offord K:** Epidemiological study of wastage among racehorses 1982 and 1983. *Vet Rec*, 116, 66-69, 1985. DOI: 10.1136/vr.116.3.66
25. **Bailey CJ, Reid SWJ, Hodgson DR, Rose RJ:** Impact of injuries and disease on a cohort of two- and three-year-old Thoroughbreds in training. *Vet Rec*, 145, 487-493, 1999. DOI: 10.1136/vr.145.17.487
26. **Ainsworth DM, Cheetham J:** Disorders of the respiratory disease. In, Reed SM, Bayly WM, Sellon DC (Eds): *Equine Internal Medicine*. 3rd ed., 290-371, Saunders-Elsevier, St. Louis, 2010.
27. **Vrins A, Doucet M, Nunez-Ochoa L:** A retrospective study of bronchoalveolar lavage cytology in horses with clinical findings of small airway disease. *J Vet Med (Series A)*, 38, 472-479, 1991. DOI: 10.1111/j.1439-0442.1991.tb01036.x
28. **Moore BR, Krakowka S, Robertson JT, Cummins JM:** Cytologic evaluation of bronchoalveolar lavage fluid obtained from standardbred racehorses with inflammatory airway disease. *Am J Vet Res*, 56 (5): 562-567, 1995.
29. **Mckane SA, Canfield PJ, Rose RJ:** Equine bronchoalveolar lavage cytology: Survey of Thoroughbred racehorses in training. *Aust Vet J*, 70 (11): 401-404, 2008. DOI: 10.1111/j.1751-0813.1993.tb06072.x
30. **Marques FJ, Lohmann KL, Lopez M, Manning S, Pinto R, Dickinson R, Campbell J, Townsend H:** A standardized bronchoalveolar lavage (BAL) technique using large volume of infused fluid in young foals under intravenous general anesthesia. *Int J Appl Res Vet Med*, 9 (4): 407-415, 2011.
31. **Hoffman AM, Viel L, Staempfli HR, Muckle CA, Yager JA:** Sensitivity and specificity of bronchoalveolar lavage and protected catheter brush methods for isolating bacteria from foals with experimentally induced pneumonia caused by *Klebsiella pneumoniae*. *Am J Vet Res*, 54 (11): 1803-1807, 1993.
32. **Womble A, Giguère S, Murthy YV, Cox C, Obare E:** Pulmonary disposition of tilmicosin in foals and in vitro activity against *Rhodococcus equi* and other common equine bacterial pathogens. *J Vet Pharm Therap*, 29 (6): 561-568, 2006. DOI: 10.1111/j.1365-2885.2006.00804.x
33. **Block W, Lammer M, Venner M:** Bronchoalveolar lavage in foals: Indication, method and results. *Pferdeheilkunde*, 27 (5): 495-503, 2011.
34. **Malikides N, Hughes KJ, Hodgson DR, Hodgson JL:** Comparison of tracheal aspirates and bronchoalveolar lavage in racehorses. 2. Evaluation of the diagnostic significance of neutrophil percentage. *Aust Vet J*, 81, 685-687, 2003. DOI: 10.1111/j.1751-0813.2003.tb12540.x
35. **Hughes KJ, Malikides N, Hodgson DR, Hodgson JL:** Comparison of tracheal aspirates and bronchoalveolar lavage in racehorses. 1. Evaluation of cytological stains and the percentage of mast cells and eosinophils. *Aust Vet J*, 81, 681-684, 2003.
36. **Ode H, Hobo S, Katayama Y, Niwa H, Kuwamoto Y, Yamane T, Anzai T:** Cytological and bacteriological observation of tracheal aspirates and bronchoalveolar lavage fluid obtained from thoroughbred racehorses with pneumonia associated with transport. *J Equ Sci*, 18, 161-165, 2007. DOI: 10.1294/jes.18.161
37. **Takizawa Y, Hobo S, Yamauchi J, Yamane T, Kuwamoto Y, Wada R, Anzai T:** Cytological and bacteriological observation of tracheobronchial aspirates from young throughbreds transported by vehicle over long distance. *J Equ Sci*, 16, 117-121, 2005.
38. **Fernandes WR, Sanches A, Ramos MCC, Souza VRC, Coelho CS:** Microbiological findings of tracheobronchial washes of healthy horses and those with respiratory diseases. *Ars Vet*, 27, 73-79, 2011.
39. **Wood JLN, Newton JR, Chanter N, Mumford JA:** Association between respiratory disease and bacterial and viral infections in British racehorses. *J Clin Microbiol*, 43, 120-126, 2005. DOI: 10.1128/JCM.43.1.120-126.2005
40. **Laus F, Attili AR, Cerquetella M, Spaterna A, Tesi B, Cuteri V:** Endoscopic findings, microbiological and cytological evaluation of tracheal aspirates in a population of Standardbred horses with poor performances. *Vet Med*, 54, 444-450, 2009.
41. **Dowling PM:** Disorders of the respiratory disease. In, Reed SM, Bayly WM, Sellon DC (Eds): *Equine Internal Medicine*. 3rd ed., 148-204, Saunders-Elsevier, St. Louis, 2010.