

Parametre der øger antallet af neutrofile granulocytter i bronchoalveolær skyllevæske hos højtpræsterende springheste.



Johanne Cæsar Juul

Afsluttende opgave i Fagdyrlæge vedr. sygdomme hos hest.

Parametre der øger antallet af neutrofile granulocytter i bronchoalveolær skyllevæske hos højtpræsterende springheste.

Resume:

Inflammation i luftvejene hos rideheste er et problem over hele verden. Det antages, at rideheste der opstaldes under konventionelle forhold oftest har en subklinisk luftvejsinflammation.

40 højtpræsterende springheste opstaldet og trænet under samme forhold blev undersøgt i dette studie. Alle hestene var uden kliniske symptomer på luftvejslidelser og præsterede som forventet.

Hestene blev undersøgt i november måned, hvor de gennemgik en klinisk undersøgelse, fik udtaget en blodprøve, blev endoskoperet hvor graden af mucus blev vurderet, og en BAL blev foretaget. Derefter blev andelen af neutrofile granulocytter vurderet.

I opgaven blev der anvendt en "cut off" værdi på 5 % neutrofile granulocytter i BALF. 77 % af hestene i populationen, havde på baggrund af dette en inflammatorisk tilstand i deres nedre luftveje.

Fire variabelers effekt på stigende andel af neutrofile granulocytter i luftvejene blev vurderet.

Transport i EU havde signifikant effekt på stigende antal neutrofile granulocytter i BALF ($p < 0.0001$). Der var en signifikant effekt af alderen på antallet af neutrofile granulocytter i BALF ($P < 0.0001$). Når transporten inkluderes, var effekten af at stå i boks med et vindue ikke signifikant ($P = 0.124$) i forhold til udgangspunktet, hvor hesten ikke havde adgang til et vindue. Mucus grad 1 ($P = 0.0015$) og mucus grad 2-4 ($P < 0.0001$) havde i forhold til grundniveauet ved mucus grad 0 en statistisk signifikant effekt på antallet af neutrofile granulocytter i BALF.

Parametre der øger antallet af neutrofile granulocytter i bronchoalveolær skyllevæske hos højtpræsterende springheste.

Abstract:

Airway inflammation in horses is a major problem world wide. It is presumed that horses placed in conventional stables often have a subclinical airway inflammation.

40 high performance jumping horses stabled and trained under the same conditions were examined in this study. The horses had no clinical signs of airway inflammation and were performing in accordance with the riders expectation.

The examination took place in November, where the horses were examined clinically. A blood sample was taken, the airway was examined endoscopically, the amount of mucus was graded and a BAL was performed. The number of neutrophils was evaluated.

By the use of a cut off value 5 % neutrophils, it was evident that 77 % of the horses had an airway inflammation in the lower airways.

If the amount of neutrophils were evaluated as increasing when the horse was postponed for the risk factors, then transport in the EU was significant ($p < 0.0001$) for an elevated amount of neutrophils in BALF. The effect on increasing age was significant ($p < 0.0001$). If the horse had access to an open window in the stable and at the same time was transported to the EU, then there was no significant effect of the window on the amount of neutrophils ($P = 0.124$). The effect of mucus grade 1 ($P = 0.0015$) and mucus grade 2-4 ($p < 0.0001$) was significant on the amount of neutrophils in BALF.

Parametre der øger antallet af neutrofile granulocytter i bronchoalveolær skyllevæske hos højtpræsterende springheste.

Indledning:

Over hele verden er inflammation i luftvejene hos heste et stort problem, da de medfører nedsat præstation i varierende grader og kan betyde, at hesten ikke kan udnytte sit fulde potentiale ^(1,2).

Undersøgelser viser, at helt op til 80 % af unge væddeløbsheste rammes af luftvejsinflammation i løbet af det første år, de er i træning ^(3,4). Af de konkurrenceheste, der opholder sig i deres staldmiljø, kun afbrudt af træning på bane eller i ridehus, vil op til 70 % udvikle en luftvejsinflammation i løbet af deres karriere ⁽⁵⁾. Anvendes hesten kun til let arbejde, vil op til 33 % af hestene have en subklinisk luftvejsinflammation, der aldrig diagnosticeres ⁽²⁾.

Ætiologien ved luftvejsinflammation anses for at være multifaktoriel hvor management, staldmiljø træningsintensitet, transport til stævner og opstaldning i fremmede miljøer menes at have indflydelse på udviklingen af inflammation i de nedre luftveje ^(1,6). Hestens staldmiljø anses som den vigtigste faktor for udviklingen af luftvejsproblemer, idet symptomerne fra luftvejene optræder hyppigere og er af længere varighed når hesten opholder sig i stalden kontra på døgnfold, her menes især støv at have stor betydning ⁽⁷⁾.

Da langt de fleste konkurrenceheste i Danmark opholder sig mange timer i deres boks hver dag, udsættes deres luftveje for bakterier, virus, støv, svampesporer, støvmider samt midernes ekskrementer, endotoksiner og gasarter, herunder ammoniak ^(6,1,8,9). Disse agens kan starte en inflammation i luftvejene ved at initiere et allergisk respons eller ved at overvinde det pulmonære immunforsvar ⁽¹⁾. En høj koncentration af støv kan hos raske heste initiere et inflammatorisk respons fra lungerne, og dermed være starten på en kronisk luftvejsinflammation ^(8,9,10). Støvet kommer hovedsageligt fra strøelse i boksen samt grovfodertildeling, men det skjulte støv fra fodertildeling, strigling af hesten og det støv, der under fejning lægger sig på inventaret, har også betydning ^(6,8,10).

Tilbydes hesten hø af et hønet, vil risikoen for inhalationen af støv og svampesporer øges betydeligt, idet hesten vil have næseborene nær høet hele tiden. Udfodres høet derimod på jorden reduceres den tid hvor hesten udsættes for støv, idet hesten vil tage en tot hø og derefter løfte hovedet og tygge ⁽⁸⁾.

Parametre der øger antallet af neutrofile granulocytter i bronchoalveolær skyllevæske hos højtpræsterende springheste.

Ved sammenligning af strøelse vil koncentrationen af støv i hestens åndedrætszone være 35 gange højere, hvis hesten står på halm og fodres med hør, end hvis hesten står på spåner og fodres med pelleteret foder ⁽⁶⁾. Endotoksinkoncentrationen i de fleste staldmiljøer er meget høj, og dette kan udløse symptomer fra luftvejene hos raske heste, der ikke har anamnese om tidligere symptomer fra luftvejene, ligesom dette kan udløse bronchiekonstriktion hos mennesker med præeksisterende luftvejsinflammation ^(1,6). Fodres der med wrap og anvendes der spåner som strøelse reduceres endotoksin koncentrationen 10 gange ⁽¹⁾.

Adgang til fold året rundt har en positiv effekt på luftvejene, idet ophold i stalden i en periode på tre måneder associeres med et højere antal og procent af inflammatoriske celler i lungerne end hvis hesten har adgang til fold døgnet rundt ⁽⁷⁾. Dårligt ventilerede stalde med en høj koncentration af de ovennævnte agens kan alene udløse en inflammatorisk tilstand i de nedre luftveje ^(1,8). En god ventilation er nødvendig for at hesten får et godt staldmiljø, og et luftskifte på 5 gange i timen synes at sikre en tilfredsstillende reduktion af den allergen koncentration, der kan udløse symptomer fra luftvejene ⁽⁶⁾. Ventilationen bør derfor udskifte 200-300 m³ luft pr hest pr time om vinteren og imellem 300 – 400 m³ pr hest pr time om sommeren ⁽¹¹⁾.

Træning og præstation på højt niveau øger risikoen for at udvikle inflammation i de nedre luftveje, da effekten af den pulmonale forsvar nedsættes, bl.a. som følge af forhøjet cortisonkoncentration i hestens blod, samtidig med at hesten inhalerer langt flere partikler under en udmattende toppræstation ^(1,6,12). Sker træningen samtidigt i koldt vejr (-5 grader) som det oftest sker på de nordlige breddegrader, vil der ske et signifikant influx af neutrofile granulocytter efter kun et træningspas og initiere et inflammatorisk respons i luftvejene ^(1,13).

Højt præsterende heste vil ofte deltage i mange konkurrencer, hvilket medfører, at de transporteres over lange afstande mange gange årligt. Under transporten er hesten enten bundet op med hovedet i kørselsretningen eller står løs i boks, der tillader en vis grad af bevægelse. Lange transporter nedsætter lungernes pulmonale forsvar, samtidig med at hesten inhalerer store mængder støv, ammoniak og bakterier ⁽¹⁾. Fikseres hestens hoved i en ventral position over en længere periode akkumuleres disse agens i de nedre luftveje. Disse elimineres 8 til 12 timer efter

Parametre der øger antallet af neutrofile granulocytter i bronchoalveolær skyllevæske hos højtpræsterende springheste.

hesten er kommet ud af transporteren, men vil stadig være en risikofaktor for udviklingen af luftvejsinflammation, især hvis hesten udsættes for hårdt arbejde umiddelbart efter ^(1,14).

På konkurrencestedet er hesten opstaldet i rejsebokse sammen med mange andre heste fra andre miljøer. I den forbindelse udsættes hesten ofte for respiratoriske virale og bakterielle patogener, der under normale omstændigheder ikke påvirker hestens luftveje. Men da det mucociliære forsvar allerede er svækket som følge af transporten, betyder det en yderligere opformering af bakterier eller proinflammatoriske agens, som vil udløse symptomer fra luftvejene ⁽¹⁾.

Mange inflammatoriske celler er involveret, når hesten har en inflammation i luftvejene. Denne artikel vil fokusere på de neutrofile granulocytter. Procentdelen af disse celler er lave ved raske heste, men responderer hurtigt ved stimuli, og antallet øges ganske betydeligt ved kontakt med en række agens ^(1,15). En undersøgelse fra 2001 sammenligner BALF hos en gruppe heste der opholder sig på døgnfold og derefter opstaldes indendørs i tre måneder. Antallet og den procentvise fordeling af neutrofile granulocytter stiger således markant når gruppen er indendørs kontra udendørs (10.8 og 3.6 %) ⁽⁷⁾

I BALF er neutrofile granulocytter morfologisk velbevaret, og der findes i litteraturen god korrelation imellem øget antal af neutrofile granulocytter og histologiske tegn på inflammation i luftvejene ⁽¹⁵⁾. Ved sportsheste anvendes der en "cut off" værdi på 5 % ^(15,16,17) neutrofile granulocytter.

Denne opgave vil forsøge at belyse hvilke variabler, der øger præstationshestens risiko for et øget antal neutrofile granulocytter i dens luftveje. Hypoteserne der undersøges er:

1. Er der en statistisk signifikant sammenhæng mellem mucus grad 0 og mucus grad 1 og mucus grad 2-4 og andelen af neutrofile granulocytter i BALF?
2. Har transport en statistisk signifikant indflydelse på andelen af neutrofile granulocytter i BALF?
3. Har alder en statistisk signifikant indflydelse på andelen af neutrofile granulocytter i BALF?
4. Har adgangen til vindue en statistisk signifikant indflydelse på andelen af neutrofile granulocytter i BALF?

Parametre der øger antallet af neutrofile granulocytter i bronchoalveolær skyllevæske hos højtpræsterende springheste.

Materiale og metode:

Hestemateriale:

Hestepopulationen, der indgår i undersøgelsen består af 40 heste, opstaldet under ens forhold hos uddannet berider. Resultaterne der anvendes til denne opgave er indsamlet i forbindelse med en sundhedskontrol af hestepopulationens luftveje.

Hestene er i alderen 2½ - 14 år hvor gennemsnitsalderen er 6 år. Hestene anvendes fortrinsvis til springning fra let niveau til grand prix. Staldanlægget er 7 år gammelt og har 48 bokse, hvoraf halvdelen er med vindue der kan åbnes. I enderne af stalden er der 4 døre, der kun lukkes om natten. Under udmugningen om morgenen åbnes alle vinduer, disse lukkes igen hen på eftermiddagen. Hestene er i deres bokse under udmugningen, og imens der tildeles strøelse, som består af rapshalm samt under fejning af staldgangen. Der tildeles kraftfoderblanding tilsat olie samt stråfoder 3 gange dagligt, og staldgangen fejes efter hver udfodring. Stråfoderet består af hør og wrap af god kvalitet. Hestene rides minimum 5 gange om ugen, intensiteten afhænger af alder og niveau, dertil kommer stævnedeltagelse i weekenderne. Udover ridningen er hestene i skridtmaskine minimum 1½ time dagligt. De unge heste er om sommeren på fold i 4 – 5 timer dagligt, imens de ældre heste samt de højt præsterende heste er på fold ca 1 time dagligt.

Hovedparten af hestene deltager i stævner på forskelligt niveau. De unge hestes deltagelse begrænser sig til Danmark, mens de rutinerede heste transporteres til EU flere gange årligt med henblik på stævnedeltagelse. Transporten foregår i lastbil, indrettet til formålet hvor hestene står skråt i køreretningen. De er ikke bundet op, hvilket betyder at de har mulighed for at bevæge hovedet frit under kørslen. Under transport af to til tre heste tilbydes de en boks, hvor de frit kan bevæge sig rundt. Hestene tilbydes vand og foder under transporten, dog får de ikke længevarende pauser, ligesom der heller ikke muges ud. Der findes ingen aircondition i lastbilen, derfor står loftlem samt vinduer i siden af vognen altid helt åbne. Alle hestene er vaccineret imod influenza i henhold til de anbefalede forskrifter fra FEI. For at deltage i undersøgelsen skulle hesten gennemgå en klinisk undersøgelse uden betydende anmærkninger. Derudover skulle en differentialtælling lavet på EDTA stabiliseret blod være uden betydende tegn på inflammatoriske

Parametre der øger antallet af neutrofile granulocytter i bronchoalveolær skyllevæske hos højtpræsterende springheste.

tilstande i henhold til laboratoriets referenceintervaller. På undersøgelsestidspunktet havde en hest feber og blev derfor udelukket fra undersøgelsen.

Klinisk undersøgelse:

Hestene gennemgik en almindelig klinisk undersøgelse forud for undersøgelsen. Berideren svarede på flere spørgsmål omkring hestens præstation, daglige rutiner samt stævnedeltagelse. Hesten blev registreret med navn og boksnummer.

Blodprøver:

Der blev udtaget en blodprøve fra vena jugularis med vacutainer system. Der anvendtes et EDTA glas, der entydigt blev mærket med hestens boksnummer. Efter blodudstrygningen på objektglas blev EDTA- røret placeret i en køletaske med køleelementer. Dagen efter blev blodprøverne sendt til differentialtælling på et godkendt laboratorium (Vet Med Lab, Tyskland).

Endoskopi:

Hestene blev sederet med detomidin 0,1 ml / 100 kg og butorphanol 0,1 ml / 100 kg. Operatøren iførte sig handsker, endoskopet fik påført gel og blev indført via venstre næsebor. Områderne der blev endoskoperet var: Cavum nasi, pharynx, larynx samt trachea. Endoskopifundene blev noteret i skemaet og i trachea blev graden af mucus registreret, fra 0 til 5 grader som beskrevet i tabel 1:

Grad	Visuel bedømmelse af mucus i trachea
1	Lille mængde, små bobler
2	Moderate mængde, store bobler
3	Markeret mængde, strømdannelse
4	Stor mængde, pool formation
5	Ekstrem mængde, profust

Tabel 1. Gradinddeling af mucus ved endoskopi af trachea ⁽¹⁸⁾.

Parametre der øger antallet af neutrofile granulocytter i bronchoalveolær skyllevæske hos højtpræsterende springheste.

Bronchoalveolar lavage (BAL):

Endoskop guidet indførtes et BAL skyllekateter fra Kruuse med en længde på 2,4 meter, diameter 10 mm og med en oppustelig ballon i enden.

Når kateteret var korrekt indført blev endoskopet fjernet og ballonen blev blæst op. Der blev skyllet med 120 ml sterilt saltvand, og straks efter aspireret. Et skummende surfactant lag var indikation på succesfuld udførelse af proceduren. Herefter blev luften taget af ballonen og kateteret taget ud. Den aspirerede væske blev visuelt bedømt med hensyn til farve, mængde og transperans. I dette studie blev anvendelsen af lidokain fravalgt på grund af den lange dopingkarantæne.

Cytologisk undersøgelse af bronchoalveolar lavage væske (BALF):

Umiddelbart efter udtagelsen blev prøverne centrifugeret og der blev lavet udstrygninger. Præparaterne blev farvet med May-Grünwald-Giemsa farvning. 200 tilfældige celler blev talt i hvert præparat under mikroskop ved 40x objektiv. Dette blev gjort i alt 4 gange af to forskellige individer og et gennemsnit af resultaterne blev beregnet.

Renseprocedure:

Imellem hver hest blev BAL-kateteret renses og skyllet to gange med Virkon S[®]. Derefter blev kateteret lagt i en opløsning med samme desinfektion i min. 5 minutter. Derpå blev kateteret renses og skyllet to gange med rent vand og til slut anbragt i en spand med rent vand.

Endoskopet blev renses og skyllet to gange med Virkon S[®] og skyllet to gange med destilleret vand, hvorpå der blev blæst luft igennem endoskopet. Afsluttende blev endoskopet tørret af med en klud påført Virkon S[®].

Parametre der øger antallet af neutrofile granulocytter i bronchoalveolær skyllevæske hos højtpræsterende springheste.

Resultater:

Statistisk analyse:

"Cut off" værdien på neutrofile granulocytter defineres i litteraturen som 5 %^(15,16,17). Ved gennemgang af resultaterne på andelen af neutrofile granulocytter i BAL på de 40 heste i besætningen, har 31 heste en andel over 5 %. Dette svarer til at 77 % af hestene i besætningen har inflammation i luftvejene uden kliniske tegn. I stedet for at dele hestematerialet op i heste med neutrofile granulocytter over eller under 5 % i BALF, fokuseres der i stedet på hvilke variabler der medfører at antallet af neutrofile granulocytter i BALF stiger.

Sammenhæng mellem de forklarende variabler alder, antal stævner, niveau og transport samt datasættets begrænsede størrelse gør, at der kun fokuseres på nogle af de forklarende variabler, og der ses derfor bort fra både hestens niveau og antallet af stævner i de efterfølgende analyser. Desuden behandles mucus helt separat, idet dette i modsætning til de andre forklarende variabler ikke kan forventes at have en årsags/virknings-effekt på andelen af neutrofile granulocytter. Mucus er blot en indirekte indikator af forhøjet andel af neutrofile granulocytter, mens de andre forklarende variabler kan være årsag til forhøjet andel af neutrofile granulocytter.

Derfor laves en statistisk model, hvor antallet af neutrofile celler modelleres som binomialfordelt med antalsparameter $n = 200$ og ukendt sandsynlighedsparameter p , hvilket er forsøgets interesseparameter, som også kan fortolkes som sandsynligheden for en tilfældigt udvalgt celle er neutrofil. En eller flere af de forklarende variable inddrages ved at specificere p via en logistisk regression. Dvs. for f.eks. to givne forklarende variable x og y , der begge er inddelt i grupper modelleres p som

$$\text{logit}(p) = \log\left\{\frac{p}{1-p}\right\} = \alpha + \beta_i x + \gamma_j y.$$

Forholdet $p/(1-p)$ kaldes odds og beskriver, hvor mange gange mere sandsynligt det er, at en tilfældigt celle er neutrofil frem for ikke neutrofil. I modellen beskriver parameteren α den grundlæggende effekt af at de to variable ligger i deres første gruppe. Parameteren β_i beskriver effekten af at x ligger i den i 'te gruppe i forhold til udgangspunktet.

Parametre der øger antallet af neutrofile granulocytter i bronchoalveolær skyllevæske hos højtpræsterende springheste.

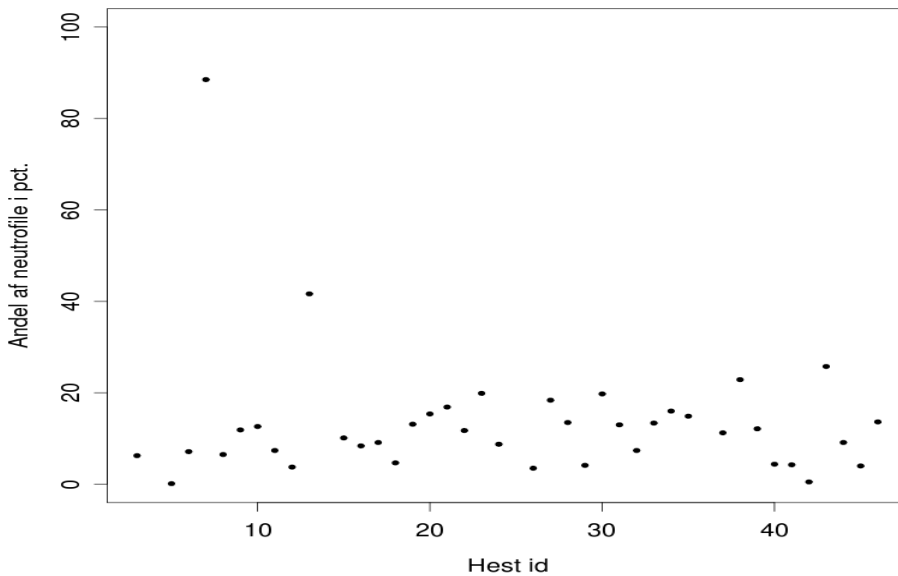
Tilsvarende beskriver parameteren γ_j effekten af at y ligger i den j 'te gruppe. Disse ukendte parametre skal alle estimeres på baggrund af data, hvilket i alt det efterfølgende gøres i den statistiske software-pakke R.

I tabel 2 præsenteres hestematerialet, imens figur 1 illustrerer fordelingen af neutrofile granulocytter hos de medvirkende heste.

Gruppe	Antal	Middel	Min.	25 %	Median	75%	Max.
Mucus 0	19	9,99	0,13	4,53	8,75	13,26	22,88
Mucus 1	9	12,81	6,50	9,13	11,88	13,63	25,75
Mucus 2	7	8,73	3,75	5,19	7,38	11,82	16,00
Mucus 3-4	5	33,88	4,00	15,38	19,88	41,63	88,50
Vindue: Nej	18	11,73	3,50	8,47	12,38	14,91	19,88
Vindue: Ja	22	14,75	0,13	4,85	10,19	14,57	88,50
Transport: Ingen	14	10,80	3,50	5,03	10,63	13,60	22,88
Transport: DK	21	11,46	0,50	7,13	11,75	14,88	25,75
Transport: EU	5	28,78	0,13	6,25	7,38	41,63	88,50
Stævner: 0-15	24	10,89	0,50	4,35	10,69	13,53	25,75
Stævner: 16-35	16	17,14	0,13	6,97	12,19	15,54	88,50
Niveau: Under MB	24	10,79	0,50	4,35	9,63	13,94	25,75
Niveau: Mindst MB	16	17,30	0,13	7,32	11,82	15,54	88,50

Tabel 2. Antal heste i hver gruppe samt middelværdien af neutrofile granulocytter i procent. Fordelingen af neutrofile granulocytter i form af minimum, maksimum samt 25%, 50% og 75% fraktilerne.

Parametre der øger antallet af neutrofile granulocytter i bronchoalveolær skyllevæske hos højtpræsterende springheste.



Figur 1. Andelen af neutrofile granulocytter i BALF.

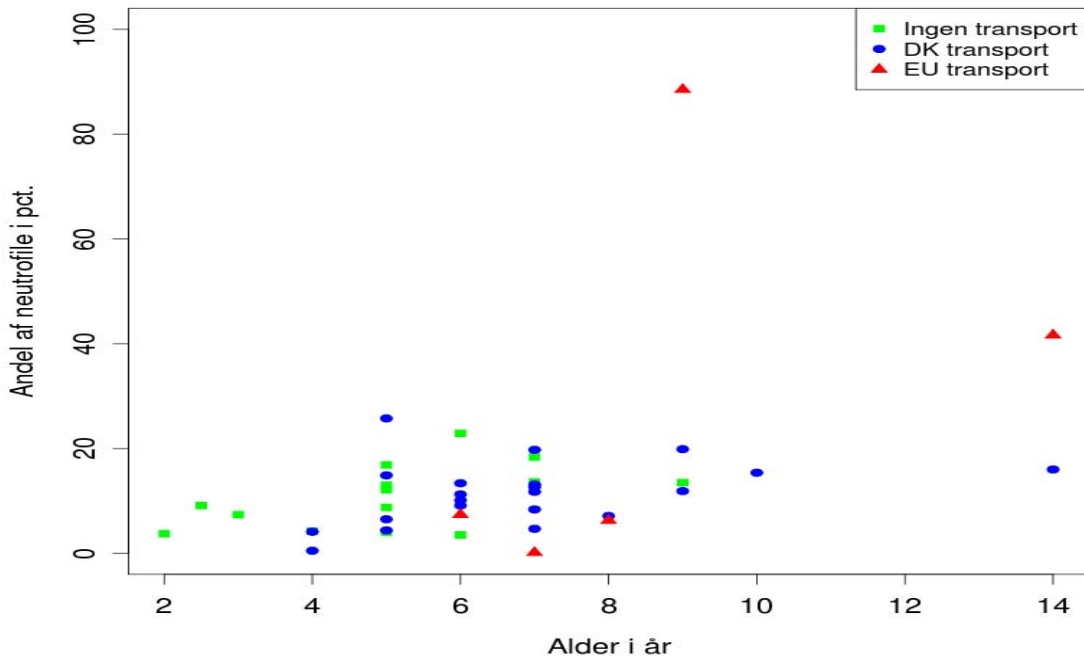
Mucus:

Beregningerne viser, at både mucus grad 1 ($P=0.0015$) og mucus grad 2-4 ($P<0.0001$) i forhold til grundniveauet ved mucus grad 0 har en statistisk signifikant effekt på andelen af neutrofile granulocytter i BALF. Den estimerede effekt svarer til at odds for en tilfældig celle er neutrofil øges med 33%, hvis der er observeret mucus grad 1, og med 114% hvis der er observeret mucus grad 2-4.

Transport :

Andelen af neutrofile granulocytter i BALF fra heste der transporteres inden for Danmark er ikke signifikant ($P=0.197$) i forhold til udgangspunktet, hvor hesten ikke transporteres. Efter sammenlægning af ingen og dansk transport er der en signifikant ($P<0.0001$) effekt af transport inden for EU (figur 2). Den estimerede effekt svarer til at odds for en tilfældig celle er en neutrofil granulocyt øges med 126 %, hvis hesten transporteres i EU.

Parametre der øger antallet af neutrofile granulocytter i bronchoalveolær skyllevæske hos højtpræsterende springheste.



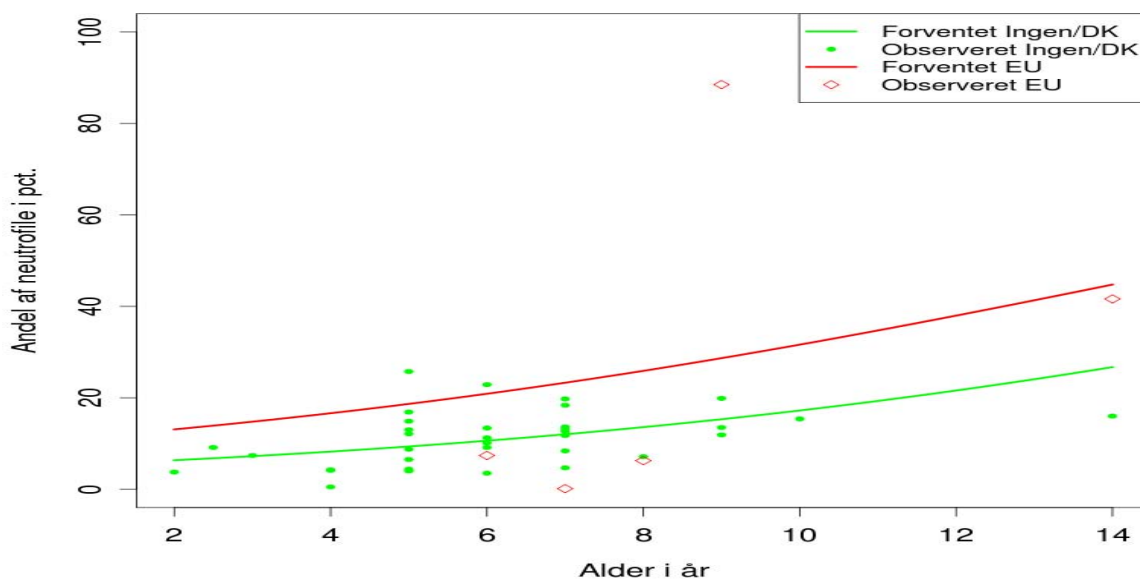
Figur 2. Andelen af neutrofile granulocytter i BALF hos heste der transporteres.

Alder:

Der ses en signifikant effekt af alderen på andelen af neutrofile granulocytter i BALF ($P < 0.0001$).

Den estimerede effekt svarer til at odds for at en tilfældig celle er en neutrofil granulocyt øges med 20 % for hvert år hesten bliver ældre. Figur 3 illustrerer at ældre heste har en stigende andel af neutrofile granulocytter i BALF. Da de ældre heste ligeledes transporteres hyppigere og til EU har denne variable betydning, når der beregnes logistisk regression på variabelen alders effekt.

Parametre der øger antallet af neutrofile granulocytter i bronchoalveolær skyllevæske hos højtpræsterende springheste.



Figur 3. Andel af neutrofile granulocytter som funktion af stigende alder.

Vindue:

Umiddelbart forventes ingen sammenhæng mellem vindue og de andre forklarende variabler alder og transport, og i princippet skulle det være muligt at teste vinduets effekt på andelen af neutrofile granulocytter i BALF uden påvirkning fra de andre variabler.

Imidlertid viser nedenstående tabel, at alle heste der transporteres i EU også står i en boks med adgang til vindue. Derfor må der tages højde for effekten af transport, når det testes om effekten af vindue er signifikant. Når transporten inkluderes i modellen er effekten af at stå i boks med et vindue ikke signifikant ($P= 0.124$) i forhold til udgangspunktet, hvor hesten ikke har adgang til et vindue.

Transport	Ingen adgang til vindue	Adgang til vindue
Ingen	8	6
Danmark	10	11
EU	0	5

Tabel 3. Heste der transporteres og deres adgang til vindue.

Parametre der øger antallet af neutrofile granulocytter i bronchoalveolær skyllevæske hos højtpræsterende springheste.

Diskussion:

Undersøgelserne af hestene blev udført over to dage. Prøverne blev opsamlet på forskellige tidspunkter i løbet af hestens normale træningsdag, og dette betød, at nogle af hestene var blevet redet eller havde været i skridtmaskinen inden prøveudtagningen. Dette kan ikke udelukkes at have medført en variation i cellematerialet^(19,20), selvom en anden undersøgelse fastslår, at træning ikke påvirker den cellulære komposition⁽²¹⁾.

Hos klinisk raske heste er en "cut off" værdi på 5 % neutrofile granulocytter i BALF generelt accepteret^(15,16,17). Når "cut off" værdien 5 % neutrofile granulocytter i BALF anvendes på denne opgaves hestemateriale, vil 77 % af hestene overstige denne værdi. Bruges "cut off" værdien på 5 % neutrofile granulocytter under de statistiske beregninger, har ingen af de forklarende variabler; alder, transport, stævnedeltagelse, træningsniveau eller adgang til vindue en signifikant effekt på andelen af neutrofile granulocytter. Undersøgelser viser, at heste og mennesker der er i intensiv træning har dobbelt så højt indhold af neutrofile granulocytter i deres luftveje sammenlignet med individer med moderat arbejde⁽²³⁾, uden dette har en klinisk betydning. Hovedparten af de 40 heste der indgår i dette talmateriale præsterer og trænes på højt plan og det kan således være en mulig forklaring på de mange heste med høje andele af neutrofile granulocytter i BALF.

Samtidig viser andre undersøgelser, at andelen af neutrofile granulocytter øges markant når hestene opstaldes i et konventionelt staldmiljø, dette sker formentlig som reaktion på det støv, hestens luftveje udsættes for, uden det nødvendigvis har indflydelse på hestens præstation^(7,22).

Selvom ætiologien bag luftvejsinflammationer er multifaktoriel, beskriver litteraturen staldmiljøet som værende en meget vigtig faktor, hvor især støv tillægges betydning^(7,8,10,25).

Denne opgave har ikke undersøgt staldmiljøets påvirkning på andelen af neutrofile granulocytter i BALF hos hestepopulationen. Dog antages det at hestene udsættes for betydelige miljøpåvirkninger, da de er mange timer i deres boks. Der anvendes halm som strøelse, og da hestene opholder sig i deres boks under udmugning, strøelsesfordeling samt fejning udsættes deres luftveje for betydelige mængder støv^(1,6,9). Derudover udsættes de for svampesporer, støvmider samt deres ekskrementer, endotoksiner samt gasarter, herunder specielt ammoniak^(1,6,8,9). Disse agens kan hver for sig og uafhængigt af hinanden udløse symptomer fra luftvejene

Parametre der øger antallet af neutrofile granulocytter i bronchoalveolær skyllevæske hos højtpræsterende springheste.

^(1,6). Ved sammenligning af strøelse vil koncentrationen af støv i hestens åndedrætszone være 35 gange højere, hvis hesten står på halm og fodres med hør, end hvis hesten står på spåner og fodres med pelleteret foder ⁽⁶⁾. Derfor ville det være sandsynligt at andelen af neutrofile granulocytter kunne reduceres, hvis strøelsen blev skiftet fra halm til spåner eller træpiller. Grovfoderet skifter imellem hør og wrap i stalden, og undersøgelser viser, at udfodring med wrap anbefales for at nedsætte støvniveauet ^(1,6,9,10).

At hestene i opgaven opholder sig så mange timer i stalden, må anses at være gældende for langt de fleste præstationsrideheste, der opstaldes i et intensivt træningsmiljø. Hestematerialet i denne opgave kan ikke direkte sammenlignes med en vilkårlig hest opstaldet i konventionelt miljø, idet disse heste oftest har adgang til fold dagligt i varierende antal timer.

Da talmaterialet var forholdsvis begrænset, var det nødvendigt at frasortere nogle variable og derfor blev træningsintensitet og præstation på et højt niveau fravalgt selvom disse øger risikoen for at udvikle luftvejsproblemer ^(1,6).

Undersøgelserne er udført i november måned, og andelen af neutrofile granulocytter i luftvejene hos konventionelt opstaldede heste er markant højere om vinteren i forhold til sensommeren ⁽²⁶⁾, dette skal naturligvis tages i betragtning, når effekten af hestens staldmiljø skal vurderes.

En af hestene var netop indkøbt fra auktion i Tyskland og havde været i stalden i to døgn da undersøgelsen fandt sted. Hesten havde feber og var nedstemt, men havde ingen kliniske tegn på symptomer fra luftvejene. Hesten var placeret i den bagerste boks med en tom boks imellem den og næste hest. Denne hest udgør en bias hvis effekt ikke kan måles med sikkerhed, men effekten anses som af mindre betydning med baggrund i den korte tid hesten havde været i besætningen på undersøgelsesdagen.

Mucus:

Akkumulering af mucus i luftvejene hos rideheste, der er udsat for støv i konventionelle miljøer, anses som værende almindeligt ⁽²⁷⁾. Hvilken betydning mucus i luftvejene har på hestens præstation er usikker, især hvis der er tale om grad 1 og 2. Ved rutinemæssige endoskopier af væddeløbsheste har op til 50 % af hestene en akkumulering af mucus i luftvejene, uden at dette tilsyneladende påvirker præstationen negativt ⁽²⁴⁾. Heste, der lider af kroniske luftvejslidelser som recurrent airway obstruction (RAO), er meget sensitive overfor støv, og allerede syv timer efter de

Parametre der øger antallet af neutrofile granulocytter i bronchoalveolær skyllevæske hos højtpræsterende springheste.

har været eksponeret herfor, vil der ske en influx af neutrofile granulocytter samt en forøget mucus akkumulering^(27,28). Det samme kan dog påvises ved klinisk raske heste, omend den procentvise stigning af neutrofile granulocytter er knap så markant i deres BALF⁽²⁸⁾. En enkelt undersøgelse finder ingen sammenhæng imellem mucusscore og antallet af neutrofile granulocytter hos asymptotiske rideheste⁽²⁷⁾. Ved udregning på denne opgaves hestemateriale var der signifikant effekt af mucus grad 1 ($P=0.0015$) og mucus grad 2-4 ($P<0.0001$) på antallet af neutrofile granulocytter i BALF i forhold til grundniveauet ved mucus grad 0. Graden af mucus ved endoskopi følger de guidelines, der er i tabel 1, men vurderingen under endoskopien er meget subjektiv efter operatørens erfaringsgrundlag. Desuden har nogle af hestene været motioneret i enten ridehus eller skridtmaskinen før BAL blev foretaget, og det kan ikke afvises, at det har en betydning for graden af mucus i luftvejene. Da undersøgelsen ligeledes blev foretaget i november måned, har hestene i flere måneder været udsat for en langvarig påvirkning af agens, der kan påvirke graden af mucus. Disse to faktorer må vurderes til at kunne behæfte resultatet i denne opgave med en vis usikkerhed.

Transport:

I tabel 2 ses det, at hestematerialet repræsenterer heste, der endnu ikke har nået konkurrenceniveau og derfor kun opholder sig i stalden, svarende til 35 % af hestene. 52,5 % af hestene bliver transporteret rundt i Danmark, imens 12,5 % af hestene transporteres både i Danmark samt til EU for at deltage i internationale stævner. Der ikke er sammenhæng imellem transporten i Danmark og forhøjet antal af neutrofile granulocytter i BALF ($P=0.197$).

Der er statistisk sammenhæng imellem transport i EU og forhøjet antal neutrofile granulocytter i BALF ($P<0.0001$), hvis udgangspunktet er de heste, der opholder sig i stalden samt de heste, der transporteres rundt i Danmark. Under transporten over lange afstande er hestene i denne undersøgelse ikke bundet, men kan bevæge sig i små bokse i lastbilen. Der er kun korte pauser undervejs, hvor hestene tilbydes vand og foder, men de forlader ikke lastbilen, ligesom der heller ikke foretages udmugning undervejs. Lange transporter nedsætter lungernes macrofagfunktion, samtidig med at hestene inhalerer store mængder støv og ammoniak^(1,8). Ammoniak er stærkt allergent samt irriterende og kan alene udløse symptomer fra luftvejene^(1,6,8), og denne koncentration må formodes at være høj i slutningen af transporten. Lastbilen har ingen mekanisk udluftning, og derfor er det kun en åben loftlem og åbne vinduer, der sørger for ventilationen i

Parametre der øger antallet af neutrofile granulocytter i bronchoalveolær skyllevæske hos højtpræsterende springheste.

lastbilen. Hestene ankommer typisk en til to dage før konkurrencerne starter og opstaldes sammen med mange heste fra andre stalde i et nyt staldmiljø. Det mucociliære forsvar svækkes af transport, og hestene er derfor mere modtagelige for patogener, der normalt ikke vil påvirke luftvejene ⁽¹⁾. Samtidig skal hestene kort efter transporten udføre krævende præstationer flere dage i træk, hvilket medfører, at effekten af det pulmonale forsvar yderligere svækkes, bl.a. som følge af den konstant forhøjede cortisol koncentration i kroppen ^(1,14). Talmaterialet i denne undersøgelse er dog lille, idet der kun er 5 heste, svarende til 12,5 %, der transporteres til EU. Denne variabel er korreleret med alderen, men ikke med antal stævner hesten deltager i pr år eller på hvad niveau hesten præsterer. Derfor bør denne statistiske signifikans tolkes med forsigtighed og afvente en afprøvning med et større talmateriale.

Alder:

I dette hestemateriale ses en signifikant effekt ($P < 0.0001$) af at stigende alder prædisponerer for forøgede antal neutrofile granulocytter i hestens luftveje. For hvert år hesten bliver ældre, øges odds for, at en tilfældig celle er en neutrofil granulocyt med 20 %. Dette stemmer overens med litteraturen på området, der påpeger at heste over 5-7 år har forhøjet risiko for inflammation i luftvejene. Dette, mener man, skyldes deres mangeårige ophold i konventionelle staldmiljøer ^(1,6,10,29,30). Gennemsnitsalderen for hestene i denne undersøgelse er 6 år, men de ældste heste transporteres meget og præsterer på højt plan og har samtidig en høj andel af neutrofile granulocytter. Dette kan naturligvis påvirke effekten af alderen, men samtidig må resultatet anses at være validt i forhold til den beskrevne litteratur.

Vindue:

I tabel 2 fremgår det at 22 heste i besætningen har adgang til et vindue og 18 heste har ikke adgang til et vindue. Ved de heste, der har et vindue, er middelværdien af antal neutrofile granulocytter 14,75 % imod 11,73 % hos de heste der ikke har et vindue. Tabel 3 viser, at de heste der har adgang til et vindue også transporteres i EU. Derfor må transporten inkluderes som variabel, når der beregnes statistisk på vinduets effekt på neutrofile granulocytter. Effekten af at stå ved vindue er ikke statistisk signifikant ($P = 0.13$). Litteraturen beskriver ellers den positive effekt på hestens luftveje, når hesten har adgang til frisk luft, og der sørges for en god udluftning i stalden ^(9,12,25,31,32). Periodevis forhøjelse af støvniveauet i staldmiljøet som følge af strigling, fodring, udmugning og fordeling af strøelse kan ikke fjernes momentant med ventilationsluften.

Parametre der øger antallet af neutrofile granulocytter i bronchoalveolær skyllevæske hos højtpræsterende springheste.

Ved et luftskifte på 0,5 gange i timen vil der efter 4,5 timer stadig være 10 % af forureningen tilbage. Ved et luftskifte på en gang i timen vil der være 10 % tilbage efter 2,5 timer, og ved et luftskifte på 2 gange i timen vil der være 10 % tilbage efter 1 time⁽¹¹⁾. Når der samtidig anbefales en udskiftning af 200-300 m³ pr hest pr time, stiller det store krav til ventilationen i stalden⁽¹¹⁾. Hestematerialet i denne opgave har kun adgang til et åbent vindue få timer hver formiddag. Herefter lukkes det, og alle hestene er nu afhængige af udluftning fra tre åbne døre i stalden, idet der ikke er mekanisk ventilation og heller ingen naturlig ventilation i kip. Og da hestene ikke kommer på fold i vinterhalvåret, er deres adgang til frisk luft begrænset. Disse forhold kan forklare den manglende effekt af vinduet, men samtidigt er det meget vigtigt at notere sig, at de heste, der står ved vinduerne, er top præsterende. De transporteres derfor ofte og deres stævnedeltagelse er høj og dette begrænser den faktiske tid, de tilbringer i deres boks med vindue. Da transporten til EU samtidig er signifikant for øget andel af neutrofile granulocytter i luftvejene, er det ikke en repræsentativ gruppe at sammenligne alle andre danske hestehold med.

Der fokuseres i denne opgave udelukkende på antallet af neutrofile granulocytter i BALF. Dette udelukker visse informationer om tilstanden i luftvejene på de undersøgte heste. Dette er naturligvis en begrænsende faktor ved tolkningen af opgavens resultater, og det anbefales fra forfatterens side at tolke på alle de fundne celler i en BALF, når diagnose og prognose skal vurderes og en behandling startes op.

Konklusion og perspektivering:

I dette studie deltog 40 præstationsheste i en sundhedskontrol af deres luftveje ved udførelse af BAL. Når en "cut off" værdi på 5 % neutrofile granulocytter i BALF blev anvendt havde 77 % af hestene en luftvejsinflammation, hvoraf de nævnte variable ikke viste statistisk signifikans for neutrofil niveau over 5 %. Dette kunne indikere, at en "cut off" værdi på 5 % neutrofile granulocytter er for lav, når hestene præsterer på højt niveau og er opstaldet under konventionelle former. Hestene i dette studie er alle asymptomatiske og ingen af hestene i dette studie præsterer under det forventede.

Når variablernes effekt blev vurderet som risikofaktorer for et stigende indhold af neutrofile granulocytter, var der signifikant effekt af alder, transport i EU samt graden af mucus på en

Parametre der øger antallet af neutrofile granulocytter i bronchoalveolær skyllevæske hos højtpræsterende springheste.

forhøjet andel neutrofile granulocytter i luftvejene. Adgangen til vindue havde i denne opgave ingen signifikant effekt på andelen af neutrofile granulocytter i luftvejene.

Det kunne være interessant at undersøge samme population af heste efter en miljøsanering der ville inkludere:

- Spåner/tørv/ træpiller som strøelse
- Alle heste på fold hver dag
- Alle heste skal ud af stalden under mugning og strøning
- Fodring med wrap
- Alle vinduer skal være åbne døgnet rundt
- Under lange transporteres udfodres hø på bunden, og der muges ud i løbet af transporten

Hos mennesker er det påvist at astmatisk bronchitis er arveligt, uden at det nødvendigvis medfører at sygdommen manifesterer sig med kliniske symptomer. Udbrud af sygdommen hænger oftest sammen med hvilke miljøfaktorer individet udsættes for. Derfor kunne det være interessant at undersøge hestepopulationens genmateriale, for om muligt at kunne genfinde samme markør hos heste med meget høje neutrofil granulocyt værdier.

Tak:

En stor tak til opgavens økonomiske sponsorer; Kruuse, Kongeriget Danmarks Hesteforsikring og Dyr lægerne Nørhald.

Stud med vet Sofie Esbjørn Høffer og Elsa Gunnarsdøttier for deres hjælp ved udtagelse af prøverne og derefter cytologisk evaluering af præparaterne.

For faglig sparring, gode råd og konstruktiv kritik skal dyrlæge Jacob Greve, dyrlæge Julie Fjeldborg samt sidst men bestemt allervigtigst dyrlæge Lars B Juul have stor tak.

Parametre der øger antallet af neutrofile granulocytter i bronchoalveolær skyllevæske hos højtpræsterende springheste.

Litteraturliste:

1. Hodgson JL & Hodgson DR (2002): Inflammatory Airway Disease. *Equine Respiratory Diseases*, P. Lekeux (Ed.) www.ivis.org
2. Pirrone F *et al.* (2007): Respiratory mechanics in Standardbred horse with subclinical inflammatory airway disease and poor athletic performance. *The Vet Journal*; 173: 144-150.
3. Robinson NE *et al* (2006): Airway inflammation in Michigan pleasure horses : Prevalence and risk factors. *Equine Vet Journal*; 38(4): 293-299.
4. Workshop Report (2003): Inflammatory Airway disease: Defining the syndrome. Conclusion of the Havemayer workshop. *Equine Vet Educ*; 15 (2): 61-63.
5. Allen K & Franklin S (2007): RAO and IAD: respiratory disease in horses revisited. *In Practice*; 29: 76-82.
6. Davis E & Rush BR (2002): Equine Recurrent airway obstruction: Pathogenesis, diagnosis, and patient management. *Vet Clin Equine*; 18: 453-467.
7. Holcombe SJ *et al* (2001): Stabling is associated with airway inflammation in young Arabian horses. *Equine Vet Journal*; 33 (3): 244-249.
8. Robinson E (2008): A practical Approach to equine lower airway disease. *Proceeding of the SEVC Southern European Veterinary Conference*. www.ivis.org.
9. Baker RJ: Chronic Obstructive Pulmonary disease. www.old.cvm.msu.edu/research.
10. Robinson NE (2001): Recurrent airway obstruction (heaves). *Equine Respiratory Diseases*, P. Lekeux (Ed). www.ivis.org
11. Pedersen J: Staldklima og miljø. Afhjælpning af klima og miljøfejl. *Kursusbilag: Respirationsvejslidelser hos hest*.
12. Raidal SL *et al* (2001): Effect of training on resting peripheral blood and BAL-derived leucocyte function in horses. *Equine Vet Jour*; 33 (3): 238-243.

Parametre der øger antallet af neutrofile granulocytter i bronchoalveolær skyllevæske hos højtpræsterende springheste.

13. Davis MS *et al* (2007): Influx of neutrophils and persistence of cytokine expression in airways of horses after performing exercise while breathing cold air. *AJVR* ; 68 (2): 185-189.
14. Smith BL *et al* (1996): Effects of road transport on indices of stress in horses. *Equine vet jour*; 28 (6): 446-454.
15. McGorum BC & Dixon PM (1994): The analysis and interpretation of equine bronchoalveolar lavage fluid (BALF) cytology. *Equine Vet Educ*; 6: 203-209.
16. Malikides N *et al* (2003): Comparison of tracheal aspirates and bronchoalveolar lavage in racehorses. 2. Evaluation of the diagnostic significance of neutrophil percentage. *Australian Vet Jour*; 81: 685-687.
17. Moore BR & Cox JH (1996): Diagnostic use of bronchoalveolar lavage in horses. *Equine Prac*; 18: 7-15.
18. Allen K & Franklin S (2007): RAO and IAD: respiratory disease in horses revisited. *In Practice*; 29: 76-82.
19. Whitwell KE & Greet TR (1984): Collection and evaluation of tracheobronchial washes in the horse. *Equine Vet Jour*; 16: 499-508.
20. McGorum *et al* (2007): Equine respiratory medicine and surgery
21. Wong CD *et al* (1990): Effect of strenuous exercise stress on chemiluminescence response of equine alveolar macrophages. *Equine Vet Jour*; 22: 33-35.
22. Dacre KJ *et al* (2007): Organic dust exposure increases mast cell tryptase in bronchoalveolar lavage fluid and airway epithelium of heaves horses. *Clin and experimental allergy*; 37: 1809-1818.
23. Holcombe SJ *et al* (2006): Does airway mucus affect racing performance and what can we do about it? 8th AAEP Annual Resort Symposium. Rome, Italy – January 19-21, 2006
24. Derksen FJ *et al* (1985): Bronchoalveolar lavage in ponies wit recurrent airway obstruction (heaves). *American Review of resp disease*; 132: 1066-1070.
25. Tremblay GM *et al* (1993): Effect of stabling on bronchoalveolar cells obtained from normal and COPD horses. *Equine Vet Jour*; 25 (3): 194-197.

Parametre der øger antallet af neutrofile granulocytter i bronchoalveolær skyllevæske hos højtpræsterende springheste.

26. Riihimäki M *et al* (2008): Markers of respiratory inflammation in horses in relation to seasonal changes in air quality in a conventional racing stable. *The Canadian Jour of Vet Research*; 72: 432-439.
27. Gerber V *et al* (2003): Airway inflammation and mucus in two age groups of asymptomatic well-performing sport horses. *Equine Vet Jour*; 35 (5): 491-495.
28. Gerber V *et al* (2004): Airway mucus in recurrent airway obstruction – short-term response to environmental challenge. *Jour Vet Intern Med*; 18: 92-97.
29. Léguillette R (2003): Recurrent airway obstruction – heaves. *Vet Clin Equine*; 19:63-86.
30. Bedenice D *et al* (2008): Association between cough and cytology of bronchoalveolar lavage fluid and pulmonary function in horses diagnosed with inflammatory airway disease. *Jour Vet Intern Med*; 22: 1022-1028.
31. Miskovic M *et al* (2007): Lung function and airway cytologic profiles in horses with recurrent airway obstruction maintained in low-dust environments. *Jour Vet Intern Med*; 21: 1060-1066.
32. Allen K and Franklin S (2007): RAO and IAD: respiratory disease in horses revisited. *In Practice*; 29: 76-82.