



*Sveriges lantbruksuniversitet*  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

# Andningsfrekvensmönster efter submaximalt arbete hos varmblodiga travhästar

André Furekull

*Uppsala*

*2013*

*Examensarbete inom veterinärprogrammet*

*ISSN 1652-8697  
Examensarbete 2013:3*



Andningsfrekvensmönster efter submaximalt arbete hos  
varmblodiga travhästar

Breathing frequency pattern after submaximal exercise in  
standardbred trotters

André Furekull

*Handledare: Clarence Kvant, Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi*

*Biträdande handledare: John Pringle, Institutionen för kliniska vetenskaper*

*Examinator: Kristina Dahlborn, Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi*

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2013*

*Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap*

*Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi*

*Kurskod: EX0754, Nivå A2E, 30hp*

*Nyckelord: häst, travare, prestation, andning, luftvägsinflammation, surfaktantprotein D*

*Key words: horse, trotter, performance, breathing, inflammatory airway disease, surfactant protein D*

*Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>*

*ISSN 1652-8697*

*Examensarbete 2013:3*



## INNEHÅLL

<b>SAMMANFATTNING</b>	1
<b>SUMMARY</b>	2
<b>INLEDNING</b>	3
<b>Effekt av träning samt metoder för att bedöma prestationsförmåga i fältmässig miljö</b>	3
<b>Orsaker till nedsatt prestation</b>	5
<i>Prestationsnedsättande orsaker som inte är relaterade till luftvägarna</i>	5
<i>Luftvägsproblem i de övre luftvägarna</i>	6
<i>Luftvägsproblem i de nedre luftvägarna</i>	7
<i>Lungblödning</i>	7
<i>Inflammation i de nedre luftvägarna</i>	7
<i>Inflammatory airway disease (IAD)</i>	7
<b>Diagnostik med lungsköljprov och trakealsköljprov</b>	8
<b>Surfaktant</b>	10
<i>Surfaktantprotein D (SP-D)</i>	11
<b>MATERIAL OCH METODER</b>	12
<b>Studiedesign</b>	12
<i>Klinisk undersökning innan huvudförsöket</i>	12
<i>Fältmässigt arbetstest</i>	12
<i>Provtagningar och mätningar efter arbetstestet</i>	13
<i>Undersökning 2-5 timmar efter arbetstestet</i>	13
<i>Hantering och analys av blodprover, lungsköljprover samt nässvabbar</i>	13
<b>Databearbetning</b>	14
<b>RESULTAT</b>	14
<b>Grupperingar</b>	14
<b>Klinisk undersökning samt EKG</b>	16
<b>Regressionsekvationer (linjär regression)</b>	16
<b>Jämförelse av parvisa observationer för alla hästar (n=24)</b>	16
<b>Gruppjämförelser</b>	17
<i>Gruppjämförelser mellan grupp A (n= 13) och grupp B (n=11)</i>	18
<i>Gruppjämförelser mellan grupp C (n=11) och grupp D (n=13)</i>	18
<i>Gruppjämförelser mellan grupp E (n=13) och grupp F (n= 11)</i>	19
<b>Lungsköljprover</b>	20

<b>DISKUSSION</b>	21
<b>Skiljer sig andningsfrekvensmönstret efter ansträngning hos varmbloodstravare med prestationsnedsättning från normalpresterande hästar?</b>	21
<b>Hur påverkas andningsfrekvensmönstret efter ansträngning av en ökad slemansamling i luftstrupen?</b>	23
<b>Är surfaktantprotein D koncentrationen i blodet en relevant analysparameter vid utvärdering av nedre luftvägsproblem?</b>	25
<b>SLUTSATS</b>	27
<b>REFERENSER</b>	28

## **SAMMANFATTNING**

Studiens målsättning var att besvara tre frågeställningar. Skiljer sig andningsfrekvensmönstret efter ansträngning hos varmblodstravare med prestationsnedsättning från normalpresterande hästar? Påverkas andningsfrekvensmönstret efter ansträngning av en ökad slemansamling i luftstrupen? Är koncentrationen surfaktantprotein D i blodet en relevant analysparameter vid utvärdering av nedre luftvägsproblem?

Hypotesen var att travhästar med subkliniska luftvägsproblem i de nedre luftvägarna har en längre återhämningsperiod efter ansträngning jämfört med friska hästar. Kopplingen mellan ökad slemansamling i luftstrupen och prestation undersöktes också.

24 varmblodstravare deltog i försöket. Innan försöket undersöktes varje häst kliniskt inkluderande vilo-EKG och luftvägsendoskopi. Själva försöket genomfördes efter ett arbetstest där hästarna gick på cirka 80 % av sin förmåga (enligt travtränarens bedömning) över 2000 meter och bestod av flertalet mätningar av andnings- och hjärtfrekvens, mätning av rektaltemperatur, blodprovstagningar, EKG efter arbete samt luftvägsundersökning med endoskop cirka 2-3 timmar efter arbetstestet.

3 olika grupperingar av hästarna gjordes med avseende på prestation (grupp A och B), slemförekomst i luftstrupen (grupp C och D) samt koncentration av surfaktantprotein D i plasma (grupp E och F).

Resultaten visar att hästar med ökad slemförekomst i luftstrupen efter ansträngning har en lägre andningsfrekvens direkt efter avslutad ansträngning samt en större skillnad mellan andningsfrekvensen direkt efter avslutad ansträngning och 11 minuter senare. Dock har slemförekomsten i luftstrupen efter ansträngning ingen direkt koppling med den bedömda prestationsförmågan. Ett annat resultat som studien gav var att normalpresterande hästar sjunker mer i andningsfrekvens från sitt högsta uppmätta värde till 11 minuter efter ansträngning och även att de hade en högre temperaturstegring och högre absolut temperatur efter ansträngning. Ingen skillnad i koncentrationer av surfaktantprotein D i plasma förelåg hos hästarna avseende prestationsförmåga eller slemförekomst i luftstrupen.

Sammanfattningsvis gav studien lovande resultat för att så småningom kunna använda andningsfrekvensmönster efter ansträngning som en indikator på luftvägspåverkan med slemansamling i de nedre luftvägarna. Användbarheten av andningsfrekvensmönster vid prestationsbedömning är mer osäkert och kräver mer forskning innan det kan tas i praktiskt bruk. Koncentrationen av surfaktantprotein D i blodet var ingen bra indikator på luftvägspåverkan vid ökad slemansamling i luftstrupen i denna studie och hade ingen koppling till prestation.

## **SUMMARY**

The purpose of this study was to answer three questions. Does the post exercise breathing frequency pattern of standardbred trotters differ between horses with decreased performance compared to horses with normal performance? Does accumulation of tracheal mucus affect post exercise breathing frequency pattern? Are surfactant protein D levels in blood a relevant parameter when evaluating disease in the lower airways?

The hypothesis was that horses with sub-clinical lower airway diseases have a longer rebreathing period after exercise compared to healthy horses. The association between excessive tracheal mucus accumulation and performance was also evaluated.

24 standardbred trotters participated in the study. Before the main event every horse was examined including electrocardiography and endoscopic evaluation of the airways. The horse underwent a field exercise test at 80 % of the animal's maximum capacity (assessed by the trainer) over 2000 meters and afterwards several measurements of breathing and heart frequency, rectal temperature, blood sampling, electrocardiography and 2-3 hours later an endoscopic evaluation of the airways took place.

The horses were divided in three main categories according to performance (group A and B), grade of tracheal mucus (group C and D) and plasma concentration of surfactant protein D (group E and F).

The results shows that horses with excessive accumulation of tracheal mucus after exercise have lower breathing frequency immediately after exercise and a larger difference between breathing frequency immediately after exercise and 11 minutes later. Excessive tracheal mucus after exercise has no apparent effect on performance assessed by the trainer. In addition, results from this study showed that horses with good performance decreased more in breathing frequency from the maximal frequency to 11 minutes after exercise and also had a higher rise in rectal temperature and absolute temperature after exercise. No difference in plasma concentration of surfactant protein D was found between horses with different performance level and different grades of tracheal mucus accumulation.

In conclusion, the results from this study are promising for a future use of breathing frequency pattern as an indicator of airway affection with excessive mucus accumulation in the lower airways. The use of breathing frequency pattern to evaluate performance is more unreliable and more research is required before this can be used in clinical situations. In this study, the concentration of surfactant protein D in blood was not a good indicator of lower airway disease with accumulation of tracheal mucus and no association to performance was found.



## INLEDNING

Nedsatt prestation är vanligt bland travhästar och är ett viktigt problem, med ekonomisk såväl som djurvälståndsmässig betydelse, som kan vara komplext och bero på ett flertal orsaker (Couroucé-Malblanc *et al.*, 2010).

I mitt arbete har jag undersökt om man med hjälp av att studera andningsfrekvensmönster efter submaximalt arbete hos varmblodiga travhästar kan skilja hästar med en prestationsnedsättning från de som presterar bra.

Studiens målsättning var att besvara tre frågeställningar. Skiljer sig andningsfrekvensmönstret efter ansträngning hos varmblodstravare med prestationsnedsättning från normalpresterande hästar? Hur påverkas andningsfrekvensmönstret efter ansträngning av en ökad slemansamling i luftstrupen? Är koncentrationen surfaktantprotein D i blodet en relevant analysparameter vid utvärdering av nedre luftvägsproblem?

Hypotesen var att travhästar med subkliniska luftvägsproblem i de nedre luftvägarna har en längre återhämningsperiod efter ansträngning jämfört med friska hästar. Kopplingen mellan ökad slemansamling i luftstrupen och prestation undersöktes också.

Först följer en kort litteratursammanställning av relevant karaktär för arbetet varefter studien presenteras. Allt i arbetet beskriver den varmblodiga travhästen om inte annat anges, för andra hästraser och hästsporter kan skillnader föreligga då travsporten ställer andra krav på hästarna jämfört med de flesta andra hästsporter.

### **Effekt av träning samt metoder för att bedöma prestationsförmåga i fältmässig miljö**

Av den energi som förbrukas av en travhäst under ett lopp har det visats att cirka 60-90 % kommer från den aeroba metabolismen medan den resterande delen kommer från anaerob metabolism (Zucca *et al.*, 2010). Hästar med hög aerob kapacitet (bra kondition) har visats vara mindre beroende av anaerob metabolism och fick en lägre mjölksyrastegring vid ansträngning jämfört med hästar med sämre kondition, låga mjölksyranivåer i blodet har visats tyda på en hög aerob kapacitet men värdet speglar inte nivån i musklerna och värdena varierar ofta vid upprepade mätningar med samma belastning (Gauvreau *et al.*, 1996).

Storleken på hjärtat är en viktig faktor som påverkar prestationsförmågan, hjärtstorleken har man visat påverkas bland annat av kroppsvikt, kön och fysisk träning (Buhl *et al.*, 2012). Hästhjärtat har även visats anpassa sig efter mängd, typ och intensitet av träning (Zucca *et al.*, 2010). Varmblodstravare på elitnivå har i en studie visats ha högre rörelsefrekvens, längre understödsfas och längre tid för påskjut under rörelse jämfört med medelmåttiga varmblodstravare vilket ger större rörelseeffektivitet (Leleu *et al.*, 2005a).

Med träning har det visats att den vävnadsspecifika metabola kapaciteten ökar genom en förändring av substraten för oxidativ fosforylering och cellandning, ökningen var linjär och proportionell med ökning av fysisk kondition (Votion *et al.*, 2012). Träning har visats förbättra den oxidativa kapaciteten i musklerna, detta ansågs framförallt bero på en ökning av antalet mitokondrier och en modifiering av cellandningen.

Tränade hästar med hög syreförbrukning har visats kräva mindre energi från glykolys (anaerob metabolism) och hade därför lägre mjölksyranivåer i musklerna och i blodet jämfört med otränade hästar vid samma ansträngningsgrad (Gauvreau *et al.*, 1996). Upptaget av syre

till musklerna vid ansträngning har visat sig underlättnas av vävnadsacidosis, hyperkapni och hypertermi (Gauvreau *et al.*, 1996). Rektaltemperaturen ökade i en studie med cirka 1,2° C omedelbart efter submaximal ansträngning med en hastighet på 10 meter/sekund jämfört med före ansträngning (Gottlieb-Vedi *et al.*, 1997).

Medelhög ansträngning under en kort tid har visats ge upphov till små muskulära skador på grund av oxidativ metabolism hos varmblodstravare då ökade koncentrationer av muskulära stressprotein kunde uppmätas efteråt (Kinnunen *et al.*, 2005). Träning under medelhög ansträngning har visats skapa högre toppar (koncentrationer) av frisatt tillväxthormon (som frisätts pulsatilt) jämfört med innan inledd träning, en längre tids hård träning ökade antalet pulser per dag och vid tidig överträning miste tillväxthormonsfrisättningen sin regelbundenhet och koncentration i blodet (de Graaf-Roelfsema *et al.*, 2009). Muskelenzymkoncentrationen av kreatininkinas har visats öka efter ett travlopp på 1600 eller 2000 meter men var tillbaka på ursprungsnivån inom 6 timmar vilket innebär att musklerna inte tar skada av den oxidativa stressen de utsätts för under hård ansträngning (Piccione *et al.*, 2007), den oxidativa stressen har föreslagits bero på en ökad oxidation av lipider (Votion *et al.*, 2012). Kort och intensiv ansträngning har visats leda till uttorkning hos varmblodstravare (Jagric *et al.*, 2012). På grund av vätskeförluster, från bland annat svett, under ansträngning har man sett bland annat ökade mängder totalprotein i blodet vilket kan mätas för att bedöma vätskeförluster (Fazio *et al.*, 2011).

Träning och konditionsnivå påverkar mjölksyranivåerna under ansträngning och venösa blodprover från halsvenen har visats ha lägre koncentration mjölksyra jämfört med artärblod på grund av den lägre metabolismen i huvudregionen jämfört med övriga kroppen (Gauvreau *et al.*, 1996). Plasmakoncentrationen av mjölksyra har visats spegla belastningen under ansträngning då ett ökat motstånd vid ansträngning gav högre mjölksyranivåer i plasma (Gottlieb-Vedi *et al.*, 1997).

Hastigheten som en häst springer på när mjölksyrakoncentrationen i blodet är 4 mmol/L benämns  $V_4$  och hastigheten då en hästs hjärta uppnår 200 slag per minut benämns  $V_{200}$ .  $V_4$  har man visat påverkas av tillväxt upp till 5 års ålder samt träning och anses vara ett bra test för att skilja på hästar med god respektive nedsatt prestationsförmåga även om det inte är helt tillförlitligt (Couroucé *et al.*, 1997). Låg  $V_4$  har i en studie indikerat nedsatt prestation under förutsättning att hästen är tillräckligt vältränad (minst 3 månaders träning) och hög  $V_4$  var mer en indikation på god prestationsförmåga.  $V_4$  var en bra indikator på varmblodstravarens prestationsförmåga (högre  $V_4$  är förknippat med snabbare tider på travbanan) medan  $V_{200}$  inte var en bra indikator på prestationsförmåga i en studie av Lindner (2010) då hjärtat anpassar sig mindre till följd av träning – mätning av hjärtfrekvens vid submaximal ansträngning anses inte vara tillförlitligt för att bedöma en hästs konditionsnivå. Upphetsning under ansträngning har visats kunna påverka hjärtfrekvensen (Gottlieb-Vedi *et al.*, 1997). Välpresterande travhästar har visats ha högre  $V_4$  och  $V_{200}$  jämfört med medelbra och dåligt presterande hästar, medelbra hästar har visats ha högre  $V_4$  och  $V_{200}$  än dåligt presterande hästar och skillnaderna var större hos 3-4 åringar jämfört med 5-6 åringar (Leleu *et al.*, 2005b). Träning hos varmblodiga travare har visats öka  $V_4$  och  $V_{200}$  efter 30 dagar och ökningen fortsatte efter 60 och 90 dagar i träning (Fazio *et al.*, 2011).

Friska hästar har visats ha lägre koncentrationer av mjölksyra i blodet och lägre hjärtfrekvens jämfört med hästar med nedsatt prestation vid samma ansträngningsgrad och detta kan användas för att bedöma prestationsförmåga och tidigt upptäcka subkliniska sjukdomar (Richard *et al.*, 2010b). 75 – 82 % av varmblodstravarna har visats ha en hög mjölksyretransportaktivitet i de röda blodkropparna i vilka upp till 50 % av all mjölksyra kan

finnas under ansträngning, mjölksyretransportaktiviteten har inte visat sig påverkas av träning hos hästar som den gör hos en del andra djurarter (Mykkänen *et al.*, 2010). Hur mjölksyretransportaktiviteten i de röda blodkropparna påverkar prestationsförmågan är inte helt utrett men det finns forskning som tyder på att hästar med mer mjölksyra i de röda blodkropparna presterar bättre. Mjölksyrenivån hos varmblodstravare minskade efter avslutad ansträngning och låg omedelbart efter trav, med en hastighet av 9 m/s på rullmatta med 3 graders lutning, på  $8,4 \pm 1,0$  mmol/L i studien av Kinnunen *et al.* (2005).

Ansträngd andhämtning har ansetts vara ett tecken på nedsatt prestation och långsammare återhämtning, andhämtningen återhämtade sig dock fort då hästen fick extra nedkylning i en studie vilket tyder på att termoregulatoriska mekanismer har betydelse vid långsam återhämtning (Knight *et al.*, 2000).

Höga koncentrationer av angiotensin-converting enzyme (ACE) i blodet kan eventuellt vara en indikator på god prestationsförmåga (Richard *et al.*, 2010b). Ny forskning tyder på att högre nivåer av ACE även kan användas som en indikator för mer allvarliga fall av lungblödning vilket kan påverka prestationsförmågan (Costa *et al.*, 2011). Hästar med nedsatt prestationsförmåga har visats ha högre koncentrationer av glutathionperoxidase och det skulle eventuellt kunna användas för bedömning av prestationsförmåga (Richard *et al.*, 2010b).

Övertränade hästar har visats ha högre hjärtfrekvens vid submaximal ansträngning och högre mjölksyrakoncentration i blodet efter ansträngning (Hamlin *et al.*, 2002). Man tror att övertränade hästar har en högre syreförbrukning vid submaximal ansträngning men inte vid maximal ansträngning. Hjärtfrekvensen 4 minuter efter ansträngning har inte visat sig skilja sig mellan friska och övertränade hästar. Övertränade hästar har inte visats ha förhöjda koncentrationer av muskelenzym i blodet. Den maximala mjölksyrekoncentrationen har visats vara lägre hos övertränade hästar jämfört med normalpresterande hästar vilket tros bero på en nedsatt förmåga att mobilisera byggstenar för mjölksyreproduktion på grund av ökade nivåer av stresshormon (de Graaf-Roelfsema *et al.*, 2009).

## **Orsaker till nedsatt prestation**

### ***Prestationsnedsättande orsaker som inte är relaterade till luftvägarna***

I en undersökning av Knight *et al.* (2000) uppvisade endast 50 % av travhästarna med nedsatt prestation någon typ av klinisk avvikelse vid undersökning direkt efter ansträngning.

Hältor och ryggproblem är de vanligaste orsakerna till nedsatt prestation hos travhästar (Knight *et al.*, 2000; Ross, 2011) vilket har visat sig genom en minskning av hastigheten, särskilt den sista fjärdedelen av loppet (Ross, 2011). Frambenschältor är lite vanligare än bakbenschältor, ofta sitter problemet i eller runt lederna och sekundära ryggproblem till följd av bakbenschälta är vanligt.

Cirka 30 % av 752 travhästar med nedsatt prestation hade i en studie blåsljud på hjärtat med klaffläckage (24,6 % tricuspidalisinsufficiens, 3,1 % mitralisinsufficiens, 1,2 % aortainsufficiens och 0,4 % pulmonalisinsufficiens), de flesta hästarna med klaffläckage (92,3 %) hade normala hjärtdimensioner vid ultraljudsundersökning och effekten på prestationsförmågan är inte utredd (Zucca *et al.*, 2010). Blåsljud på hjärtat kan anses vara kliniskt relevanta om de överstiger grad 3/6 och har ett måttligt till kraftigt läckage i klaffarna vid ultraljudsundersökning. Klaffläckage är vanligt hos varmblodstravare som tränas hårt men ingen påverkan av prestationsförmåga har hittats däremot har det i studier visats att klaffläckage kan ge upphov till arytmier vid ansträngning och både ultraljud och EKG anses

därför vara användbart när det gäller bedömning av eventuell påverkan och diagnostik av hjärtsjukdom (Buhl, 2009; Buhl *et al.*, 2012). Fysiologiska blåsljud har inte visat sig ha klinisk betydelse för hästar (Buhl, 2009).

Åtminstone 18 % av 345 varmblodstravare hade i en studie hjärtarytmier direkt efter ansträngning och de hästar som travar hade högre frekvens arytmier jämfört med de som går i passgång (Physick-Sheard *et al.*, 2010). Övrig belastning (fysisk eller mental) verkar öka risken för utvecklande av arytmier hos travhästar. Det skiljer sig mellan hur väl olika hästar tål den belastning de utsätts för och arytmier efter ansträngning kan eventuellt indikera maximal prestation eller underliggande sjukdom hos den enskilda individen. Arytmier efter ansträngning har inte visat sig ha någon direkt påverkan på hästar men kan potentiellt påverka prestationsförmågan, kammararytmier kan även vara fatala (Physick-Sheard *et al.*, 2010; Buhl *et al.*, 2012).

Överträning är ett tillstånd som ger prestationsnedsättning i flera månader hos travhästar, orsaken tror man är någon form av stress, träningsrelaterad eller av annan orsak, som leder till försämrad återhämtning mellan träningspassen (Golland *et al.*, 2003; Wijnberg *et al.*, 2008). Vid överträning anses inte den nedsatta prestationsförmågan bero på förändrad aerob metabolism utan andra mekanismer tros ligga bakom, muskelenzymnivåerna hos övertränade hästar har inte visat sig skilja sig från friska individer (Wijnberg *et al.*, 2008). Överträning har visats leda till viktminskning och man har även sett att de fått en lägre maximal hematokrit däremot har man i studien av Golland *et al.* (2003) inte kopplat samman överträning med polycytemi (ökat antal röda blodkroppar) och det anses inte vara användbart att mäta röda blodkroppar för att diagnostisera överträning (Golland *et al.*, 2003). Tidigare forskning har visat ett samband mellan polycytemi och överträning men dessa studier har inte varit prospektiva (framåtblickande) vilket studien av Golland *et al.* (2003) var (McKeever, 2003).

Magsår anses kunna påverka prestationen negativt och runt 70 % av svenska varmblodstravare i travträning har visats ha någon form av magsår (Jonsson *et al.*, 2006). Viloperioder på cirka 1,5 vecka efter intensiv träning har visat sig minska förekomsten av magsår (de Graaf-Roelfsema *et al.*, 2010). Prestationsförmågan hos varmblodiga travare har inte visats vara negativt sammankopplad med parasitinfektion av blodmaskar, däremot har man sett ett samband med hög förekomst av blodmaskägg i avföring och placering 1-3 i tävlingsomgång i en studie med 213 varmblodstravare (Fog *et al.*, 2011).

### **Luftvägsproblem i de övre luftvägarna**

Anomalier i övre luftvägarna är relevanta orsaker till nedsatt prestation och diagnostiseras med dynamisk endoskopi av svalget under hård ansträngning (Dart *et al.*, 2005; Desmaizieres *et al.*, 2009; Priest *et al.*, 2012).

Många hästar (61 %) med övre luftvägsanomalier har visat sig ha onormala andningsljud vid ansträngning (Priest *et al.*, 2012) och av hästar med onormala andningsljud vid ansträngning har 95 % visat sig ha övre luftvägsanomalier, däremot har 85 % av hästar med prestationsnedsättning och normala andningsljud vid ansträngning inte visat sig ha någon övre luftvägsanomali (Desmaizieres *et al.*, 2009). Hästar med övre luftvägsproblem kan ha samtidigt nedre luftvägsproblem (Couroucé-Malblanc *et al.*, 2002).

Dorsal förskjutning av mjuka gommen (DDSP) är den vanligaste funktionsnedsättande övre luftvägsförändringen som kan leda till nedsatt prestation (Desmaizieres *et al.*, 2009; Priest *et al.*, 2012). DDSP kan bero på luftvägsinfektion men även andra stressfaktorer kan orsaka förändringen, exempelvis har hästar med DDSP och samtidig hälta visats bli friska från DDSP

när hältan behandlats utan annan medicinsk eller kirurgisk åtgärd vilket tros bero på att när stressen hältan utlöst är borta försvinner DDSP av sig själv (Couroucé-Malblanc *et al.*, 2010).

### **Luftvägsproblem i de nedre luftvägarna**

#### *Lungblödning*

Lungblödning är väldigt vanligt och sågs i en studie i 27 av 28 travhästars lungsköljprover baserat på förekomst av hemosiderofager samt makroskopiskt utseende av lungsköljsvätskan (rödfärgad vätska) (Lavoie *et al.*, 2011). Travhästar med lindrig lokaliserad inflammation i lungorna anses ha större risk att utveckla lungblödning vilket gör inflammatory airway disease (IAD, se nedan) till en potentiell orsak till utvecklande av lungblödning (McKane *et al.*, 2010).

#### *Inflammation i de nedre luftvägarna*

Subkliniska sjukdomar är vanligt hos varmblodiga travhästar med prestationsnedsättning. I en studie hade 84 % av hästarna med prestationsnedsättning sjukdom i nedre luftvägarna (IAD, inflammation i luftstrupen, lungblödning) och av dessa hade flertalet (30/38) mer än en sjukdom vid samma tillfälle (Richard *et al.*, 2010b). Användandet av bedömning av slemförekomst i luftstrupen anses vara ett användbart hjälpmedel att diagnostisera sjukdomar i nedre luftvägarna (Ramzan *et al.*, 2008). Inflammation i de nedre luftvägarna har visat sig vara väldigt vanligt hos hästar som vistas i stallmiljö (Gerber *et al.*, 2003). Hosta anses vara ett relativt säkert tecken på nedre luftvägssjukdom hos unga hästar (Kusano *et al.*, 2008). Galopphästar med sjukdom i nedre luftvägarna har visat sig ha mer slem i luftstrupen än friska hästar och graden av slem har visat sig stämma väl överrens med uppvisandet av kliniska symtom.

Hos travhästar med nedsatt prestation har samband med förekomst av måttligt till kraftigt ökade mängder slem i luftstrupen visats (Richard *et al.*, 2010b) vilket även studier av galopphästar med nedsatt prestation och nedsatt lungfunktion visat (Evans *et al.*, 2011; Holcombe *et al.*, 2006), andra har inte funnit detta samband (Saulez *et al.*, 2009). Ökad mängd slem i luftstrupen hos kliniskt friska sporthästar (hoppning, dressyr) har visat sig vara vanligt vid prestationsnedsättning (Widmer *et al.*, 2009) men nedre luftvägsinflammation hos sporthästar verkar inte påverka deras prestation då hästar med dessa symtom har visats kunna prestera på den nivå som krävs av dem ändå (Gerber *et al.*, 2003).

#### *Inflammatory airway disease (IAD)*

Inklusionskriterier för diagnos av IAD bör minst vara nedsatt prestation, motionsintolerans eller hosta med eller utan ökade mängder slem i luftstrupen i kombination med icke-septisk inflammation i lungsköljprovsvätska (se avsnitt om lungsköljprover längre ned), exklusionskriterier är ansträngd andning i vila samt tecken på systemisk infektion (feber etc.) (Couëtil *et al.*, 2007). En del hästar med IAD har inga förändringar i lungsköljprover och för dessa individer kan istället lungfunktionstester användas för diagnosställande (Couëtil *et al.*, 2007). En kombination av lungfunktionstest och lungsköljprov anses kunna ge en mer korrekt diagnos (Evans *et al.*, 2011). Hästar med IAD har visat sig ha luftvägsförträngningar, den totala luftvägsresistansen har visat sig vara ökad hos hästar med IAD vilket tyder på en förträngning i de nedre luftvägarna (Richard *et al.*, 2009). IAD är subklinisk när man bedömer andningsmönstret i vila och sjuka hästar skiljer sig inte från friska hästar (Pirrone *et al.*, 2007) men i vissa fall kan en ökad andningsfrekvens ses samt ökade andningsljud och svaga biljud vid auskultation höras (Couëtil *et al.*, 2007). Ny forskning av Richard *et al.* (2012) har visat att varmblodstravare med IAD har högre nivåer av surfaktantprotein D jämfört med hästar med friska lungor (se utförligare beskrivning om proteinet längre fram i texten).

I en studie omfattande 148 galopphästar som undersöktes flera gånger under 3 års tid hade 70 % av hästarna med IAD måttligt till kraftigt ökade mängder slem i luftstrupen, av de hästarna med måttligt till kraftigt ökade mängder slem i luftstrupen hade 91 % IAD medan endast 10 % av hästarna med lindrigt ökade mängder slem i luftstrupen hade IAD (Wood *et al.*, 2005).

De underliggande immunologiska mekanismerna vid IAD är inte fullständigt utredda men undersökningar visar att flera olika mekanismer kan orsaka IAD (Lavoie *et al.*, 2011). Icke-infektiösa orsaker, exempelvis damm, anses vara centrala för utvecklandet av IAD men även andra orsaker kan vara inblandade (bland annat infektiösa orsaker såsom virus och bakterier, luftallergener, endotoxiner, luftföroreningar, torr och kall omgivning) men i dagsläget saknas tillförlitliga bevis för detta (Couëtil *et al.*, 2007). IAD kan orsakas av infektion enligt Wood *et al.* (2005), andra anser att bakteriell kolonisering i nedre luftvägarna är en konsekvens av IAD och inte orsaken utan endast förlänger och förvärrar sjukdomen (Couroucé-Malblanc *et al.*, 2010). Virusinfektion i övre luftvägarna har visat sig kunna predisponera för IAD, vaccination ger inte fullgott skydd mot virusinfektioner i luftvägarna (van Maanen *et al.*, 2005).

IAD är sannolikt underdiagnostiserat hos travhästar (Lavoie *et al.*, 2011; Moore *et al.*, 1996). Prevalensen (sjukdomsförekomsten) hos galopphästar i Storbritannien har visat sig vara 14 % men med över 25 % drabbade individer i enskilda stall (Wood *et al.*, 2005), frekvensen har visat sig minska med ökande ålder från 2 till 4 år (Ramzan *et al.*, 2008; Wood *et al.*, 2005). Sjukdomsperioden (durationen) hos unga galopphästar med IAD i Storbritannien har visat sig vara i medeltal 8 veckor utan behandling, med generellt kortare sjukdomsperiod hos äldre individer (Wood *et al.*, 2005). Vid antibiotikabehandling, som är en vanlig behandling vid nedre luftvägsinfektioner, har sjukdomsperioden hos galopphästar visat sig vara cirka 2-3 veckor men enstaka individer har visats kunna ha sjukdomen i flera månader trots antibiotikabehandling (Ramzan *et al.*, 2008). Andra behandlingsalternativ finns, exempelvis lågdos interferon alfa (50 U) vilket har visat sig kunna minska inflammationen i de nedre luftvägarna hos travhästar med prestationsnedsättning genom att verka antiviralt och immunomodulatoriskt, högre doseringar (450 U) har däremot inte visat sig ge någon förändring vilket kan bero på att skadliga inflammatoriska responser utlöses vid för höga nivåer interferon alfa (Moore *et al.*, 1996; Moore *et al.*, 1997).

IAD kan påverka prestationen negativt enligt vissa författare (Couëtil *et al.*, 2007; Couroucé-Malblanc *et al.*, 2002) medan andra tycker att med den nuvarande definitionen (sedan 2007) på IAD är prestationspåverkan inte känd, därför bör man alltid väga samman anamnes och kliniska fynd när man bedömer lungsköljprover (Richard *et al.*, 2010a). Man har dock visat att travhästar med IAD har lägre maximal hastighet vid ansträngning vilket indikerar prestationsnedsättning (Richard *et al.*, 2012).

### **Diagnostik med lungsköljprov och trakealsköljprov**

Lungsköljprov anses vara ett bra diagnostiskt hjälpmedel för att hitta orsaken till prestationsnedsättning (Couroucé-Malblanc *et al.*, 2002). Både lung- och trakealsköljprov (trakealinspirat) anses av vissa behövas för att fullständigt bedöma luftvägarna då de olika proverna vid samma provtagningsstillfälle på samma häst har visats ge olika cytologiska svar, anledningar till detta kan vara olika sjukdomsorsaker eller inflammationens utbredning (lokal eller generell) (Malikides *et al.*, 2003).

Andelen inflammationsceller i lungsköljprover på friska hästar har varierat i olika studier och varit upp till 15 % neutrofiler, runt 1-2 % eosinofiler och 0,2 – 6,6 ( $\pm$  5,5) % mastceller (Richard *et al.*, 2010a). Luftvägsinflammation föreligger då neutrofilerna överstiger 5

respektive 20 % vid lung- respektive trakealsköljprov enligt Malikides *et al.* (2003). Eosinofili, ökat antal eosinofiler, i luftvägarna vid lungsköljprov har visat sig vara förknippat med nedre luftvägssjukdom hos unga varmblodiga travare (Hare *et al.*, 1998; Lavoie *et al.*, 2010) medan högre celltal och neutrofiler har visat sig vara vanligare hos äldre travhästar (Lavoie *et al.*, 2010). Eosinofiler har visats vara jämnt fördelade i de nedre luftvägarna och kan bedömas både i lung- och trakealsköljprov till skillnad från mastceller som visats finnas mer i de distala luftvägarna och alveolerna och därför bäst bedöms i lungsköljprov (Hughes *et al.*, 2003). Absolut antal celler av varje typ hade varit bättre att analysera enligt Hughes *et al.* (2003) jämfört med procentandelar, då särskilt vid höga celltal, då det anses bättre spegla förändringar i luftvägarna men det är betydligt svårare att genomföra praktiskt. För att säkert bestämma andelarna av respektive inflammationscell i ett lungsköljprov bör minst 300 celler räknas, och för att säkert bestämma andelen mastceller bör 500 celler räknas (Richard *et al.*, 2010a).

Hästar med IAD har enligt nuvarande definitionen av Couëttil *et al.* (2007) vanligtvis ökat cellantal i lungsköljprov tillsammans med lindrig eosinofili (ökat antal eosinofiler), lymfocytos (ökat antal lymfocyter), monocytos (ökat antal monocyter) och ibland hos unga galopp- och travhästar ökad andel mastceller (över 2 %) samt ökad andel eosinofiler (över 0,1 %) (Couëttil *et al.*, 2007). Enligt Richard *et al.* (2009, 2012) skall minst ett av följande kriterier vara uppfyllt för att diagnosen IAD skall ställas med cytologisk undersökning av lungsköljprovsvätska 60 minuter efter ansträngning: minst 10 % neutrofiler, minst 2 % mastceller eller mer än 1 % eosinofiler. Infektion med parasiter skulle eventuellt kunna ge inflammation med karakteristisk eosinofili i lungsköljprover (Riihimäki *et al.*, 2008) vilket skulle kunna misstas för IAD.

Den nuvarande definitionen av IAD av Couëttil *et al.* (2007) anses av Cardwell *et al.* (2011) försvåra diagnosställandet av subkliniska nedre luftvägssjukdomar i trav- och galoppstall på grund av svårigheten att göra lungsköljprov och de föreslår att man ska skilja på IAD diagnostiserad med lungsköljprov och benämna detta brIAD och IAD diagnostiserad med slembedömning i luftstrupen i kombination med trakealinspirat för trIAD.

Många hästar utan kliniska symtom på luftvägssjukdom har visats ha över 20 % neutrofiler i trakealsköljprov, därför bör inte endast neutrofilandelen i trakealsköljprov användas för diagnosställande av IAD utan endast i kombination med kliniska symtom på luftvägssjukdom, exempelvis ökad slemförekomst i luftstrupen (Wood *et al.*, 2005). Att helt förlita sig på cytologisk undersökning av trakealsköljprover är inte tillräckligt för att ställa en korrekt diagnos vid luftvägssjukdomar utan en kombination med lungfunktionstest anses av Evans *et al.* (2011) ge en mer korrekt diagnos. Trakealsköljprov anses vara av bäst diagnostiskt värde 1-2 timmar efter ansträngning då celler och sekretioner transporteras runt mer i luftvägarna under ansträngning (Malikides *et al.*, 2007).

Hästar med IAD har i lungsköljprov visats ha högre nivåer av totalprotein, albumin, immunoglobulin G och A samt även ökad prokoagulationsaktivitet vilket kan förklaras med en ospecifik subepitelial inflammation med utsöndring av plasmaproteiner i luftvägarna (Moore *et al.*, 1997). Det har visats förekomma olika typer av cytokiner i lungsköljprov från IAD-drabbade hästar och det varierar med vilken typ av cytologiskt svar lungsköljprovet ger vilket indikerar olika underliggande sjukdomsförlopp vid IAD (Lavoie *et al.*, 2011).

Nedsatt prestation har inte visat sig vara sammankopplat med andelen neutrofiler i trakealsköljprov (Evans *et al.*, 2011; Holcombe *et al.*, 2006). Hög andel neutrofiler i trakealsköljprov har visats vara sammankopplat med låga relativa gasflöden (vilket tyder på

begränsad lungfunktion) vid spirometri (lungfunktionstest) (Evans *et al.*, 2011). Nästan hälften (45 %) av de välpresterande travarna i en studie av Couroucé-Malblanc *et al.* (2010) hade IAD baserat på lungsköljprov 60 minuter efter ansträngning (cytologiska gränser: >15 % neutrofiler, >2 % mastceller eller >1 % eosinofiler) och effekten av IAD på prestationsförmågan är inte helt kartlagd. Normalpresterande travhästar med IAD hade i en studie lägre andel neutrofiler i lungsköljprov samt färre bakterier i trakealsköljprov jämfört med de hästar som har nedsatt prestation med IAD och dorsal förskjutning av mjuka gommen (DDSP) (Couroucé-Malblanc *et al.*, 2010).

Upp till 27 % av alla trakealsköljprover har visats vara sterila, även om det förekommer bakterier i ett prov kan det röra sig om kontaminering eller normalflora i luftstrupen och behöver inte vara patogena (Couroucé-Malblanc *et al.*, 2010). Antalet bakterier i trakealsköljprov har visats stämma överrens med graden av slemansamling i luftstrupen hos travare, många olika bakterier har visats förekomma (ofta i blandflora) men *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus* var vanligare hos hästar med nedsatt prestation och IAD än andra bakterier i en studie av Laus *et al.* (2009).

Graden slem i luftstrupen, vid ansamling av mer slem än normalt, har visat sig stämma överrens med andelen neutrofiler i trakealsköljprov (Gerber *et al.*, 2004; Laus *et al.*, 2009) samt lungsköljprov (Koblinger *et al.*, 2011). Neutrofiler har visat sig vara en viktig faktor när det gäller ansamlandet av slem i de nedre luftvägarna och anses spegla inflammationen i de nedre luftvägarna (Koblinger *et al.*, 2011; Laus *et al.*, 2009). Av de galopphästar som deltog i studien av Wood *et al.* (2005) och bedömdes ha IAD hade 97 % måttligt till kraftigt ökad andel neutrofiler i trakealsköljprov, i samma studie fann man ett samband mellan ökad andel neutrofiler i trakealsköljprov och måttligt till kraftigt ökad slemförekomst i luftstrupen.

## Surfaktant

Surfaktant i lungorna hos hästar har visats bestå till över 80 % av fosfolipider samt cirka 12 % surfaktantproteiner (finns 4 stycken, A-D), resten är olika fettsyror (Christmann *et al.*, 2009). Den ytspänningshämmande effekten görs av fosfolipiderna samt surfaktantprotein B och C medan surfaktantprotein A och D är en del av lungans immunförsvar. Fosfolipidnivåerna har visat sig sjunka med stigande ålder, men sammansättningen av surfaktant bibehålls, vilket kan göra äldre hästar mer känsliga för surfaktantförändringar som sker vid lungsjukdom. Föl har visats ha högre ytspänning i lungorna än vuxna hästar och även lite annorlunda sammansättning av fosfolipider vilket speglar lungans omogenhet samt annorlunda behov – vid lungsjukdom har man också sett förändringar i fosfolipidsammansättningen (Christmann *et al.*, 2006). Ytspänningen har visat sig vara låg men något högre i luftstrupen jämfört med i alveolerna vilket kan bero på skillnader i sammansättningen eller i koncentrationen av fosfolipider (Im Hof *et al.*, 1997).

Friska hästar har visats ha högre koncentration av fosfolipider i lungsköljprovsvätska jämfört med hästar med recurrent airway obstruction (RAO, kronisk inflammation i luftvägarna), sammansättningen har dock visat sig vara oförändrad hos hästar med RAO och funktionen tycks vara oförändrad (Christmann *et al.*, 2010). Låga nivåer av surfaktant (som finns i överskott i friska hästars lungor) kan försämra avslappningen av den glatta muskulaturen i luftvägarna (ger trängre luftvägar) och exponera receptorer för irriterande ämnen vilket leder till bronkiell hyperresponsivitet. Förändrade koncentrationer av fosfolipider har även visats kunna påverka slemelimination negativt med slemansamling som resultat. Vid transport av hästar har man visat att hästarna får en sänkning av koncentrationen fosfolipider och surfaktantprotein A och D i lungsköljprovsvätska vilket eventuellt skulle kunna sänka lungornas immunförsvar och leda till ökad känslighet att utveckla inflammation eller



infektion i lungorna (Hobo *et al.*, 2001).

Surfaktantnivåer i luftvägarna kan förändras genom minskad produktion och sekretion, ökad nedbrytning av inflammatoriska enzym eller celler samt inhibering av surfaktantfunktionen genom ansamlande av ödem eller inflammatoriskt exsudat som gör att surfaktanten inte längre fungerar som den skall (Christmann *et al.*, 2010; Hobo *et al.*, 2001). Surfaktantprotein D läcker ut till cirkulationen i större grad än surfaktantprotein A vid lungskada och anses därför vara en bättre biomarkör för lungskador (Sorensen *et al.*, 2007).

### **Surfaktantprotein D (SP-D)**

SP-D är en stor hydrofil molekyl med immunoregulatoriska funktioner som främst produceras i distala och proximala luftvägarna (alveolarcell typ II, Claraceller, bägarceller och trakeobronkiella körtelceller) men även förekommer på andra ställen i kroppen, bland annat magtarmkanalen, reproduktionsorganen, ledkapslar, bihålor och bröst- och bukhinnan (Haczku, 2008).

SP-D kan neutralisera och aggregera patogener (bakterier, virus, pollen, kvalster), opsonisera för fagocytos, lysa gramnegativa bakterier, inhibera växt av svamp och bakterier, binda till apoptotiska celler och underlätta makrofagnedbrytandet av dessa och neutralisera endotoxiner vilket gör SP-D till en viktig komponent i försvaret mot bakterier, virus, svamp och andra patogena eller allergena substanser (Forbes *et al.*, 2010; Haczku, 2008; Kankavi *et al.*, 2006; Sorensen *et al.*, 2007). SP-D fungerar kemotaktiskt på monocyter, kan inhibera T-cellsfunktioner och aktiverar inte komplementsystemet (Forbes *et al.*, 2010; Haczku, 2008). Utan SP-D är individen känsligare för infektioner i luftvägarna, får en kraftigare akut inflammationsreaktion och är mer sårbar för kronisk inflammation samt får en ökad mängd apoptotiska celler i lungan vilket leder till inflammation (Forbes *et al.*, 2010; Haczku, 2008; Sorensen *et al.*, 2007). Mycket av forskningen är gjord på andra djurslag än häst men mellan ryggradsdjuren anses proteinet vara mycket likartat (Haczku, 2008).

SP-D nivåerna i luftvägarna ökar vid exponering för allergiframkallande ämnen, en ökad förmåga att producera SP-D minskar den allergiska reaktionen och utvecklande av hyperreaktiva luftvägar (Haczku, 2008). Exakt hur SP-D fungerar på cellnivå vet man inte men SP-D kan både upp och nedreglera immunförsvaret beroende på vad situationen kräver (Forbes *et al.*, 2010; Haczku, 2008). SP-D fungerar antiinflammatoriskt och kan på sikt eventuellt användas vid medicinerings av inflammationer i lungan (Forbes *et al.*, 2010).

Surfaktantprotein D koncentrationen i blodet höjs snabbt, före serum amyloid A, vid skada på lungalveoler och sjunker snabbt till ursprungskoncentration när skadan är läkt (Forbes *et al.*, 2010; Hobo *et al.*, 2007). Ålder och kön påverkar koncentrationen av SP-D hos människor (Sorensen *et al.*, 2007). SP-D koncentrationen i blodet hos varmblodiga travhästar med IAD har visat sig vara generellt sett högre jämfört med friska hästar, IAD förknippas med måttlig höjning av SP-D i serum (under 150 ng/ml) medan alla friska individer ligger under 60 ng/ml i studien av Richard *et al.* (2012). Mätning av SP-D hos varmblodiga travare har med en ELISA visats ha en sensitivitet på 0,82 och en specificitet på 0,90 med avseende på IAD och prover tagna i vila har inte visats skilja sig från prover tagna 60 minuter efter ansträngning (Richard *et al.*, 2012). SP-D nivåer i blodet har inte visat sig vara sammankopplat med någon typ av inflammatorisk celltyp i lungsköljprov, inte heller med maximal hastighet vid ansträngning. Huruvida lungblödning påverkar koncentrationen SP-D i blodet är inte utrett.

Exakt hur SP-D kommer ut i blodomloppet och sedan elimineras och huruvida SP-D endast indikerar läckage från lungorna eller om det förekommer naturligt i kärlsystemet eller inte är

inte fullständigt utrett (Sorensen *et al.*, 2007).

## **MATERIAL OCH METODER**

Studiens målsättning var att besvara tre frågeställningar:

Skiljer sig andningsfrekvensmönstret efter ansträngning hos varmblodstravare med prestationsnedsättning från normalpresterande hästar?

Hur påverkas andningsfrekvensmönstret efter ansträngning av en ökad slemansamling i luftstrupen?

Är koncentrationen surfaktantprotein D i blodet en relevant analysparameter vid utvärdering av nedre luftvägsproblem?

24 varmblodiga travhästar i träning på en större träningsanläggning i Mellansverige användes i studien varav 10 ston, 9 hingstar samt 5 valacker med medelåldern  $3,6 \pm 0,8$  år (2-6 år) och medelvikten  $481 \pm 25$  kg (435 – 585 kg). Av tränaren, bedömdes 13 stycken av hästarna vara normalpresterande och 11 stycken prestera under förväntan.

Kriterier för inkluderande i studien: varmblodig travhäst i tävlingsinriktad travträning.

Kriterier för exkluderande i studien: pågående medicinering eller klinisk sjukdom.

### **Studiedesign**

Studien pågick mellan den 19 oktober och 2 november 2012, 3 hästar deltog varje försöksdag spritt över totalt 8 dagar. Alla mätningar samt bedömningar av undersökningar gjordes av A. Furekull som vid undersökningstillfället inte kände till tränarens bedömning av prestation.

### ***Klinisk undersökning innan huvudförsöket***

1-3 dagar innan hästarna genomförde huvudförsöket togs ett vilo-EKG för rytmbedömning och de övre luftvägarna (näshåla, svalg) samt luftstrupens två övre tredjedelar bedömdes med endoskop (1 meter långt) med huvudfokus på slemförekomst i luftstrupen med hjälp av ett protokoll validerat av Gerber *et al.* (2004). I korthet användes följande kontinuerliga bedömningsskala vid gradering av slem i luftstrupen: grad 0 = inget slem i luftstrupen, grad 1 = flera små slemklumpar, grad 2 = större slemklumpar, grad 3 = ventral strängbildning av slem, grad 4 = pölbildningar av slem, grad 5 = mycket kraftiga mängder slem. Även färg och lokalisering av slem i luftstrupen noterades men användes inte för bedömning vid resultatbearbetning.

På morgonen samma dag som huvudförsöket undersöktes varje häst noggrant med avseende på andningsfrekvens, hjärtfrekvens, auskultation av hjärta (för bedömning av eventuell förekomst av arytmier eller blåsljud) samt andningsvägar (luftstrupe samt lungor), vätskestatus (munslemhinnan avseende färg och fuktighet samt kapillär återfyllnadstid, hudturgor), näs- och ögonflöde, hostrespons, palpation av käklymfknotor, rektaltemperatur, noggrann palpation av extremiteter samt bedömning av hälta i trav på rakt spår på ett hårt underlag. Vikt skattades i samband med den kliniska undersökningen med hjälp av ett viktmåttband.

### ***Fältmässigt arbetstest***

Innan arbetstestet värmdes hästen först upp i långsam trav under 5-6 kilometer och därefter sattes en pulsmätare (polarklocka, CS600X Trotting) på. Själva arbetstestet utfördes på en sandbelagd ovalbana med slät yta och bestod av ett 2000 meter långt träningspass med

konstant hastighet. Hastigheten var individuell för varje häst (mellan 80 – 85 sekunder per kilometer) och bestämdes av tränaren som uppskattade att hästen vid denna hastighet gick på 80 % av maxkapaciteten, hastigheten (minuter/kilometer) kontrollerades av kusken med ett stoppur. Samtliga arbetstester genomfördes mellan klockan 08.30 och 11.30 med en utetemperatur mellan -1,6 och 9,0°C med en luftfuktighet på mellan 61 – 95 %, väderförhållanden var goda med endast duggregn samt lätt snöfall under 3 av försöksdagarna.

### **Provtagningar och mätningar efter arbetstestet**

Direkt efter genomfört arbetstest stannades hästen på travbanan (med undantag av tre individer som kördes upp till stallet cirka 50 meter därifrån) där en tidtagare startades, detta är nolltiden (tidpunkt 1), där andningsfrekvensen noterades (manuellt bestämt genom att notera bröstorgans och näsborrarnas rörelser) under 20 sekunder varefter hjärtfrekvensen noterades (auskultation med stetoskop) efter 0,5 minuter (alla tider räknas med nolltiden som basvärde) under 20 sekunder (tidpunkt 1) – samtidigt togs ett venöst blodprov från jugularvenen (för mättnings- och provtagningsöversikt se tabell 1). Hästen skrittade därefter upp till ett stall där en ny mätning av andningsfrekvens ägde rum vid 2 minuter (20 sekunders registrering vid all frekvenstagning efter arbetstestet) (tidpunkt 2) samt hjärtfrekvens vid 2,5 minuter (tidpunkt 2). Därefter skrittade hästen runt stallbyggnaden och var tillbaka i stallet vid 7 minuter (tidpunkt 3) då ny andningsfrekvens togs samt hjärtfrekvens vid 7,5 minuter varefter hästen stod stilla tills alla mätningar och provtagningar var avslutade. Vid 8 minuter mättes rektaltemperatur. Blodprov togs runt 9 minuter varefter andningsfrekvens samt hjärtfrekvens registrerades en sista gång vid 11 respektive 11,5 minuter (tidpunkt 4). Mellan cirka 8 minuter och 12 minuter togs ett EKG kontinuerligt för rytmbedömning.

*Tabell 1: Mätningar och provtagningar direkt efter avslutat arbetstest, alla tidsangivelser utgår från nolltiden direkt efter avslutat arbetstest*

	0 min	0,5 min	2 min	2,5 min	7 min	7,5 min	8 min	9 min	11 min	11,5 min
Andningsfrekvens	X		X		X				X	
Hjärtfrekvens		X		X		X				X
Rektaltemperatur							X			
Blodprovstagning	X							X		

### **Undersökning 2-5 timmar efter arbetstestet**

Andningsfrekvens samt rektaltemperatur mättes 2-5 timmar efter arbetstestet (22/24 av hästarna mellan 2-3 timmar) varefter endoskopi av luftvägarna som beskrivet tidigare genomfördes samt bedömdes. En nässvabb (eSwab) togs i den näsborre som inte endoskoperats (högra) efter att den torkats med papper. På 4 av hästarna med ökad slemförekomst vid endoskopiundersökning togs det sedan lungsköljprov (se nedan) 9 – 13 dagar senare.

### **Hantering och analys av blodprover, lungsköljprover samt nässvabbar**

Blodproverna togs huvudsakligen (21/24 hästar) med spruta och kanyl vid första provtagningsstillfället, tre av dessa togs dock med vacutainerteknik vilket även alla blodprover vid andra provtagningsstillfället togs med. Blodprovsrör utan tillsats, med LitiumHeparin eller med EDTA användes. Direkt efter blodproverna tagits lades de i vattenbad med kylklamp varefter rören med tillsatser centrifugerades i 20 minuter vid 3000 rpm och plasman

avskiljdes och frystes ner till  $-20^{\circ}\text{C}$ . Röret utan tillsats, som togs vid andra blodprovstagningen, fick stå och koagulera i 30 minuter innan centrifugering som ovan och avskiljning av serum och nerfrysning till  $-20^{\circ}\text{C}$ . De nerfrysta proverna transporterades sedan i fryslåda till en  $-80^{\circ}\text{C}$  frys för förvaring innan vidare analys av proverna.

Blodprovsanalyser efter alla prover insamlats: Mjölksyra analyserades från EDTA-plasma från båda provtagningstillfällena (L-Lactic acid UV-method, Cat. No. 10 139 084 035. R-BIOPHARM AG, An der neuen Bergstrasse 17, D-64297 Darmstadt, Germany). Surfaktantprotein D analyserades från EDTA-plasma taget vid andra provtagningstillfället (Human Surfactant Protein D ELISA, Cat. No. RD194059101. BioVendor GmbH, Im Neuenheimer Feld 583, D-69120 Heidelberg, Germany). Troponin I (cTnI) analyserades från LitiumHeparin-plasma taget vid första provtagningstillfället (Enzyme immunoassay, Architect CI8200. Abbot Laboratories, Diagnostic Division, Abbot park, IL). Fler analyser gjordes men då de inte presenteras i arbetet tas dessa inte upp, dessa analyser bestod bl.a. av hematologi, akutfasprotein, blodgaser, kreatininkinas och vid bedömning av dessa provsvar ansågs dessa inte påverka bedömningen av de parametrar som presenteras i arbetet.

Lungsköljproverna togs från en total infusionsmängd av 300 ml NaCl med sex 50 ml sprutor varav mittensektionen (vätskan från spruta 4 och 5) av den återaspirerade vätskan (drygt 100 ml) skickades för manuell analys av procentuell fördelning av inflammationscellerna. Proverna förvarades i rumstemperatur fram tills inlämning för analys 3 timmar senare. Nässvabbarna frystes ner till  $-80^{\circ}\text{C}$  inom 5 timmar från provtagningstillfället och sparades för eventuell framtida analys.

## **Databearbetning**

All data presenteras som medelvärde  $\pm$  standardavvikelse om inte annat anges. Vid beräkning av statistik användes t-test för parvisa observationer samt gruppjämförelse, statistisk signifikans är om inte annat anges  $p < 0,05$ . Regressionsekvationen med beräkning av korrelationskoefficient och determinationskoefficient användes också. Alla beräkningar är gjorda manuellt utan datorprogram.

Tre olika grupperingar av data gjordes:

- 1 – tränarens bedömning av prestation, normalpresterande = grupp A samt prestation under förväntan = grupp B
- 2 – bedömning av slem i luftstrupen (baserat på protokollet från Gerber et al. (2004), se beskrivning tidigare) efter arbetstestet,  $<$  grad 2 = grupp C, minst grad 2 = grupp D
- 3 – bedömning av surfaktantprotein D koncentration i plasma,  $<$  60 ng/ml = grupp E,  $>$  60 ng/ml = grupp F

## **RESULTAT**

### **Grupperingar**

13 av hästarna i försöket bedömdes av tränaren vara normalpresterande (grupp A) och 11 prestera under förväntan (grupp B).

11 av hästarna hade en gradering av slem i luftstrupen under 2 (grupp C) och 13 hade en gradering av minst 2 (grupp D).

13 av hästarna hade en koncentration av surfaktantprotein D i plasma under 60 ng/ml (grupp E) och 11 hade koncentrationer överstigande 60 ng/ml (grupp F).

Varje hästs grupptillhörighet samt grunddata visas i tabell 2. Sex av hästarna i studien ansågs av tränaren inte vara i tävlingskondition varav två tillhörde grupp A och fyra grupp B (se tabell 2).

Tabell 2: Indelning i grupper samt grunddata för varje häst. (S= sto, V= valack, H= hingst, SP-D= surfaktantprotein D). Andnings- samt hjärtfrekvens är uppmätt vid 0 respektive 0,5 minuter efter avslutat arbetstest, temperaturen 8 minuter efter avslutat arbetstest. \* = ej i tävlingskondition, ^ = positiv hostprovokation, += hälsa grad 1, #= kraftig lungblödning

Häst	Ålder (år)	Kön	Vikt (Kg)	Andningsfrekvens/min	Temperatur (°C)	Hjärtfrekvens/min	Slem efter ansträngning (grad)	SP-D (ng/ml)	Grupp
1	4	H	441	60	39.4	117	1	50.8	ACE
2*	2	S	469	57	39,6	123	1	23.5	ACE
3^	4	H	461	75	40.0	102	1	39.4	ACE
4^+	3	H	496	63	39.9	126	1.5	42.6	ACE
5	4	S	503	57	39.3	132	1.5	42.6	ACE
6	6	H	540	66	39.8	114	0	138.6	ACF
7*+	2	S	461	90	39.8	132	1	157.8	ACF
8^	3	S	455	63	39.2	144	1	77.9	ACF
9^	3	S	482	69	39.3	120	2	53.0	ADE
10#	4	H	435	36	39.4	123	2	43.7	ADE
11	4	V	462	54	39.8	123	2	156.6	ADF
12	3	H	455	72	39.2	111	2.5	336.4	ADF
13+	6	S	482	42	39.8	120	3.5	623.2	ADF
14*	4	H	489	84	39.2	138	1	104.0	BCF
15*	3	V	461	51	38.5	129	0	78.5	BCF
16^	3	H	585	60	39.3	114	0	288.0	BCF
17*	3	V	475	48	39.0	141	2	49.0	BDE
18^	5	S	489	42	39.2	123	2	48.9	BDE
19	3	S	511	51	39.5	108	3	50.8	BDE
20+	5	S	507	57	39.7	135	3	27.6	BDE
21	3	V	468	78	39.5	105	2	21.3	BDE
22	3	S	511	66	39.1	123	2	39.6	BDE
23*+	3	H	441	63	39.5	111	2	176.9	BDF
24+	4	V	475	69	39.7	141	2	457.7	BDF

## **Klinisk undersökning samt EKG**

Två av de normalpresterande hästarna samt en av de hästarna med nedsatt prestation hade inga fynd vid klinisk undersökning.

Sex av hästarna hade positiv hostrespons, fyra av dessa var normalpresterande (se tabell 2). En av de normalpresterande hästarna hade vid undersökning av luftvägarna med endoskop kraftig lungblödning (se tabell 2). Ingen av hästarna uppvisade tecken på övre luftvägsproblem.

Hältor (grad 1) och ledsvullnader förekom men skiljde sig inte avsevärt mellan normalpresterande hästar och hästar med nedsatt prestation (se hältor i tabell 2).

Andra kliniska fynd förekom inte avseende det som undersöktes.

Alla EKG, både tagna i vila samt strax efter arbete, bedöms visa en normal hjärtrytm för varje enskild häst.

## **Regressionsekvationer (linjär regression) (n=24)**

Vid analys av sambandet mellan andningsfrekvens vid 0 minuter efter avslutat arbetstest (variabel x) och mjölksyrakoncentrationen i plasma vid 0 minuter efter avslutat arbetstest (variabel y) fanns inget direkt samband ( $r = 0,21$  samt  $r^2 = 0,045$ ).

Vid analys av sambandet mellan andningsfrekvens vid 7 minuter efter avslutat arbetstest (variabel x) samt rektaltemperaturen vid 8 minuter efter avslutat arbetstest (variabel y) fanns inget direkt samband ( $r = 0,22$  samt  $r^2 = 0,046$ ).

Vid analys av sambandet mellan andningsfrekvens vid 7 minuter efter avslutat arbetstest (variabel x) samt mjölksyrakoncentrationen i plasma vid 9 minuter efter avslutat arbetstest (variabel y) fanns inget samband ( $r = 0,09$  samt  $r^2 = 0,0087$ ).

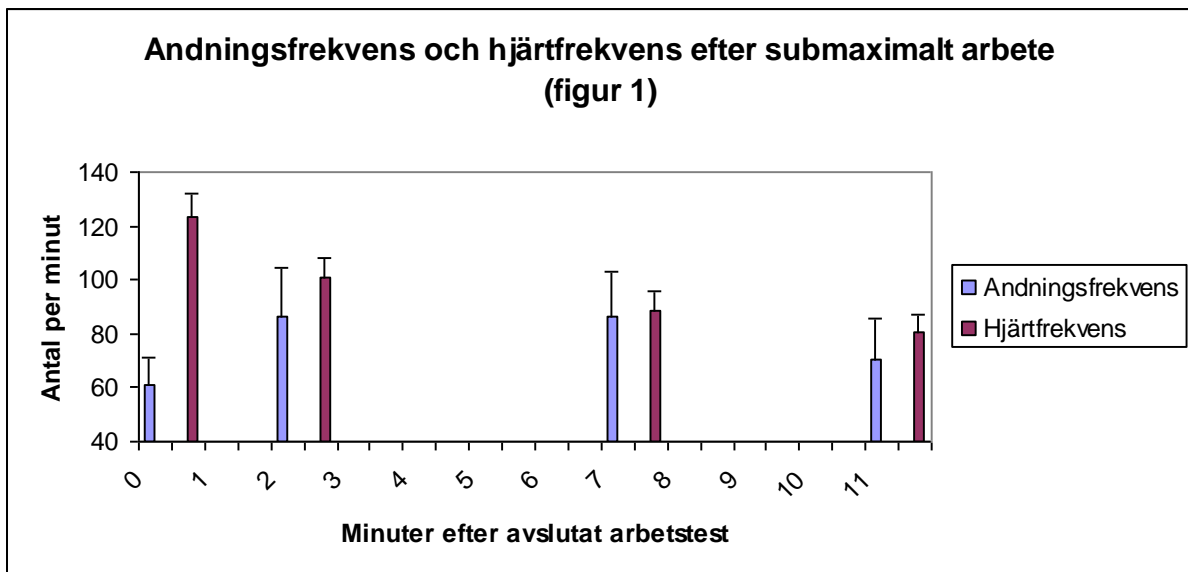
## **Jämförelse av parvisa observationer för alla hästar (n=24)**

Andnings- samt hjärtfrekvens redovisas i figur 1. Hjärtfrekvensen sjunker mellan alla mätpunkter ( $p < 0,001$ ). Andningsfrekvensen skiljer sig mellan alla mätpunkter ( $p < 0,001$ ) utom mellan 2 och 7 minuter där ingen skillnad föreligger.

Graden av slem i luftstrupen ökar efter arbete ( $1,6 \pm 0,7$ ) jämfört med innan arbete ( $1,1 \pm 0,8$ ) ( $p < 0,01$ ).

Rektaltemperaturen ökar ( $1,8 \pm 0,3^\circ\text{C}$ ) vid arbete jämfört med innan arbete för att sedan normaliseras igen efter 2-5 timmar ( $37,7 \pm 0,2$  i vila mot  $37,7 \pm 0,2^\circ\text{C}$  2-5 timmar efter ansträngning) ( $p < 0,001$ ).

Koncentrationen mjölksyra i blodet är högre vid 0 minuter jämfört med 9 minuter ( $16,4 \pm 3,5$  mmol/L mot  $11,8 \pm 4,2$  mmol/L) ( $p < 0,001$ ).



Figur 1: Genomsnittlig andningsfrekvens och hjärtfrekvens efter submaximalt arbete för alla hästar deltagandes i studien (n=24).

## Gruppjämförelser

Vid gruppjämförelserna förelåg ingen direkt skillnad i könsfördelning mellan grupperna.

Vid statistiska jämförelser mellan grupperna analyserades följande parametrar: ålder, vikt, temperaturökning till följd av arbete, absolut temperatur vid 8 minuter, mjölksyrans halveringstid i plasma, mjölksyrakoncentrationer vid 0 respektive 9 minuter, gradering av slem i luftstrupen före samt efter arbetstest, surfaktantprotein D koncentrationer i plasma, hjärtfrekvens vid 0,5 - 2,5 - 7,5 samt 11,5 minuter, andningsfrekvens vid 0 - 2 - 7 samt 11 minuter, skillnaden i andningsfrekvens från 0 minuter till 2 - 7 och 11 minuter, skillnaden i andningsfrekvens vid 0 minuter mot medelvärdet av frekvensen vid 2 och 7 minuter, skillnaden i andningsfrekvens från medelvärdet av 2 och 7 minuter mot frekvensen vid 11 minuter. Det som skiljde sig signifikant mellan grupperna är det som redovisas nedan, för övriga värden förelåg ingen skillnad vid  $p < 0,05$ .

Relevant grunddata för de gruppvisa jämförelserna där ingen signifikant skillnad förelåg mellan grupperna presenteras i tabell 3.

Alla hästarna hade en koncentration av cTnI (troponin I) på under 2 µg/ml.

Tabell 3: Genomsnittliga grunddata gruppvis för några parametrar

	SP-D (ng/ml)	Mjölksyra direkt efter arbetstest (mmol/L)	Halveringstid mjölksyra (min)	Kilometertid för genomfört arbetstest (s)
Grupp A	137 ± 112	15,2 ± 4,0	13,1 ± 3,4	83,4 ± 0,7
Grupp B	122 ± 101	17,8 ± 2,6	17,5 ± 7,7	82,9 ± 1,1
Grupp C	95 ± 56	16,9 ± 3,7	14,3 ± 2,8	83,4 ± 0,7
Grupp D	160 ± 147	15,9 ± 3,1	15,6 ± 7,0	83,0 ± 1,0
Grupp E	41 ± 8	17,0 ± 2,8	15,5 ± 5,0	83,0 ± 1,0
Grupp F	236 ± 138	15,6 ± 4,2	14,3 ± 4,7	83,4 ± 0,6

### Gruppjämförelser mellan grupp A (n= 13) och grupp B (n=11)

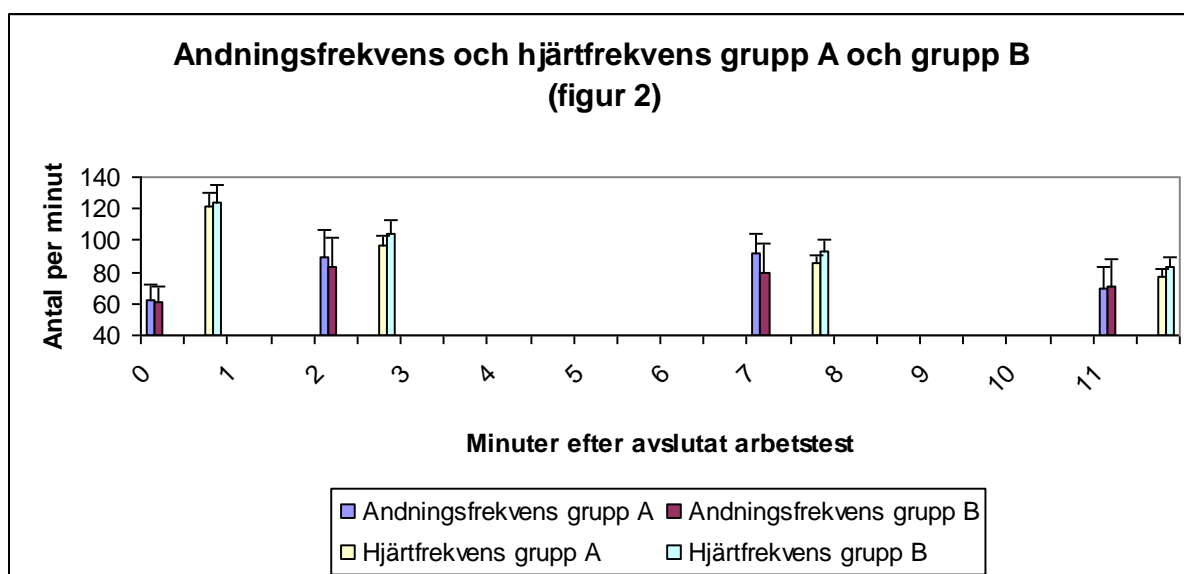
Andnings- samt hjärtfrekvens redovisas i figur 2, trots synbara skillnader i andningsfrekvens vid tidpunkt 2 och 3 mellan grupperna förelåg ingen statistisk signifikant skillnad på grund av stor spridning av andningsfrekvensen i båda grupperna.

Grupp A har en större temperaturstegring vid arbete ( $2,0 \pm 0,3$  mot  $1,6 \pm 0,3^\circ\text{C}$ ) jämfört med grupp B ( $p < 0,001$ ) samt högre rektaltemperatur vid 8 minuter ( $39,6 \pm 0,3$  mot  $39,3 \pm 0,3^\circ\text{C}$ ).

Grupp B har mer slem i luftstrupen i vila innan arbete (grad  $1,6 \pm 0,9$  mot  $0,7 \pm 0,6$ ) jämfört med grupp A ( $p < 0,001$ ).

Grupp B har högre hjärtfrekvens vid 2,5 samt 7,5 och 11,5 minuter jämfört med grupp A.

Grupp A sjunker mer i andningsfrekvens från medeltalet av 2 och 7 minuter till värdet vid 11 minuter ( $21 \pm 11$  mot  $11 \pm 9$  andetag/minut) jämfört med grupp B, det bör dock beaktas att grupp A har en högre andningsfrekvens vid 2 och 7 minuter jämfört med grupp B (dock inte statistiskt signifikant skillnad) vilket gör att de har en större möjlighet till en större sänkning av andningsfrekvensen (se figur 2).



Figur 2: Genomsnittlig andningsfrekvens och hjärtfrekvens för grupp A och grupp B.

### Gruppjämförelser mellan grupp C (n=11) och grupp D (n=13)

Andnings- samt hjärtvärden redovisas i figur 3.

Grupp D har mer slem i luftstrupen i vila innan arbete (grad  $1,46 \pm 0,8$  mot  $0,73 \pm 0,66$ ) jämfört med grupp C.

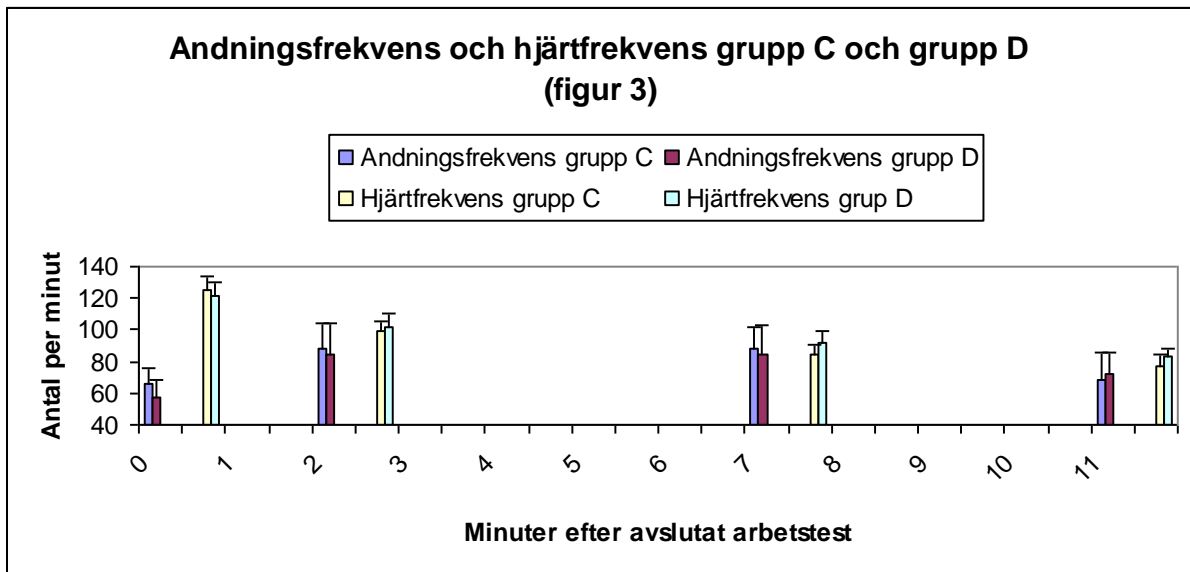
Grupp D har mer slem i luftstrupen efter arbete (grad  $2,31 \pm 0,43$  mot  $0,82 \pm 0,45$ ) jämfört med grupp C ( $p < 0,001$ ).

Grupp D har högre hjärtfrekvens vid 7,5 minuter jämfört med grupp C.

Grupp C har högre andningsfrekvens vid 0 minuter jämfört med grupp D.

Grupp C har lägre skillnad mellan andningsfrekvensen vid 0 minuter och andningsfrekvensen vid 11 minuter ( $-2,73 \pm 10$  mot  $-14,3 \pm 9,5$  andetag/minut) jämfört med grupp D ( $p < 0,01$ ), dock har grupp C högre andningsfrekvens initialt (se figur 3) och detta utgör den största delen av den föreliggande skillnaden vilket bör tas i beaktande.





Figur 3: Genomsnittlig andningsfrekvens och hjärtfrekvens för grupp C och grupp D.

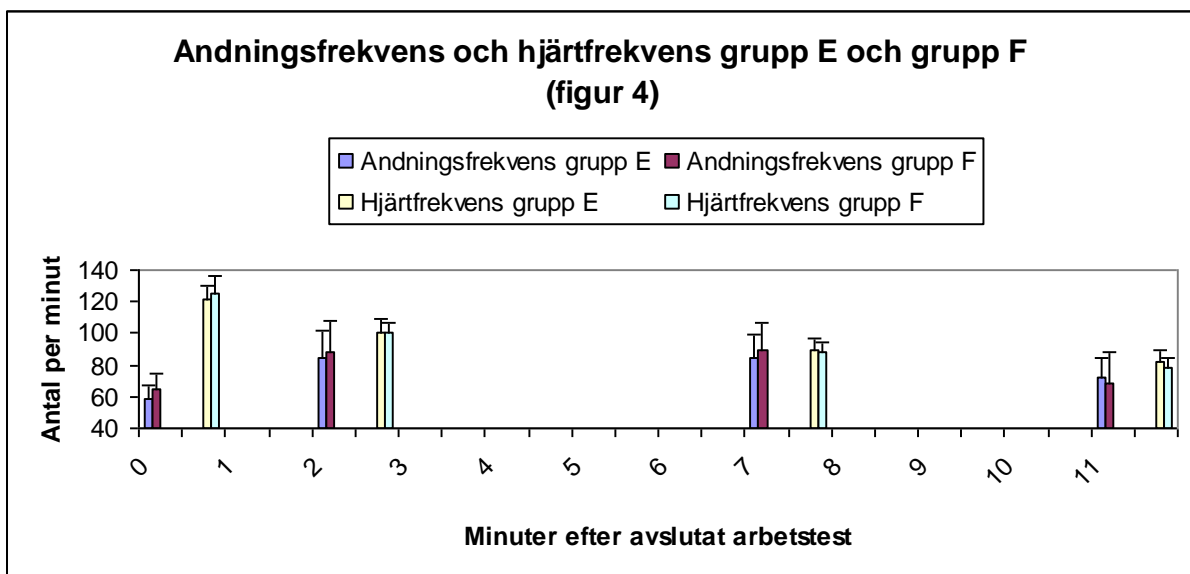
**Gruppjämförelser mellan grupp E (n=13) och grupp F (n= 11)**

Andnings- samt hjärtfrekvens redovisas i figur 4.

Grupp F har högre nivåer av surfaktantprotein D i plasma ( $236 \pm 138$  mot  $41 \pm 8$  ng/ml) jämfört med grupp E ( $p < 0,001$ ).

Grupp F har lägre skillnad mellan andningsfrekvensen vid 0 minuter och andningsfrekvensen vid 11 minuter ( $-4,1 \pm 13,2$  mot  $13,2 \pm 8,6$  andetag/minut) jämfört med grupp E.

Grupp F sjunker mer i andningsfrekvens från medeltalet av 2 och 7 minuter till värdet vid 11 minuter ( $22,2 \pm 12,2$  mot  $12,8 \pm 10,1$  andetag/minut) jämfört med grupp E.



Figur 4: Genomsnittlig andningsfrekvens och hjärtfrekvens hos grupp E och grupp F.

## Lungsköljprover

Tabell 4: Provsvar på lungsköljprover

Hästnummer	12	9	20	19
Leukocyter (10x6/L)	160	150	130	130
Makrofager %	49	58	61	66
Lymfocyter %	46	26	21	23
Neutrofiler %	2	3	2	4
Eosinofiler %	<1	8	0	1
Mastceller %	4	5	6	7

Alla provtagna hästar kan enligt definitionen av bland andra Couëttil *et al.* (2007) diagnostiseras med sjukdomen inflammatory airway disease (IAD) – nummer 9 och 19 på grund av ökat antal eosinofiler och samtliga hästar på grund av ökat antal mastceller (se tabell 4). Hästarna med nummer 9 och 12 tillhör grupp A och nummer 19 och 20 tillhör grupp B.

Gradering av slem i luftstrupen före och efter arbetstestet samt vid provtagningstillfället är som följer i tabell 5 nedan.

Tabell 5: Gradering av slem i luftstrupen hos hästar det tagits lungsköljprov på

Hästnummer	12	9	20	19
Före arbetstest	2	2	2	3
Efter arbetstest	2,5	2	3	3
Vid provtagning	1	3,5	1	2,5

## DISKUSSION

### Skiljer sig andningsfrekvensmönstret efter ansträngning hos varmbloodstravare med prestationsnedsättning från normalpresterande hästar?

Resultaten i denna studie visar att bedömning av andningsfrekvensmönster efter ansträngning eventuellt skulle kunna användas vid bedömning av prestation då andningsfrekvensen sjunker från medeltalet av andningsfrekvensen mellan 2 och 7 minuter efter ansträngning till andningsfrekvensen vid 11 minuter, här ser man i studien att normalpresterande hästar (grupp A) sjunker mer än hästar med nedsatt prestation (grupp B) och denna trend finns även vid jämförelse mellan grupp C och D (där grupp C sjunker mer, signifikant vid  $p < 0,1$ ).

Det bör dock beaktas att grupp A har en högre andningsfrekvens vid 2 och 7 minuter jämfört med grupp B vilket gör att de har en större möjlighet till en större sänkning av andningsfrekvensen (se figur 2).

Snabbare totaltider vid travlopp har visats vara förknippat med större lungkapacitet hos välpresterande hästar, snabbare hästar har visats ha högre tidalvolym (antal liter luft som byts ut vid varje andetag) och större inandningsvolym per minut men lägre andningsfrekvens vid ansträngning vid maximal syreupptagningsförmåga (Gauvreau *et al.*, 1995). Andningen påverkas av hur mycket koldioxid som andas ut varje andetag, det i sin tur påverkas bland annat av ökningen av mjölksyra och inte den absoluta mjölksyrakoncentrationen i blodet (Gauvreau *et al.*, 1996). Hästar med IAD och/eller lungblödning har nedsatt lungfunktion och har visats utveckla hypoxi snabbare än friska hästar vid ansträngning (Sánchez *et al.*, 2005). Andningsfrekvensen var inte sammankopplad med vare sig rektaltemperatur eller mjölksyrakoncentrationen i plasma i denna studie.

En viktig parameter att ta hänsyn till vid bedömning av andningsfrekvensmönstret efter ansträngning är huruvida alla hästar hade samma grad av ansträngning vid arbetstestet.

6 av hästarna (25 %) i denna studie ansågs av tränaren inte vara i tävlingskondition, 2 tillhörde den normalpresterande gruppen och 4 gruppen med nedsatt prestation. Detta kan spela roll vid bedömning av parametrar som bland annat mjölksyrakoncentrationer i blodet efter ansträngning och eventuellt även i tränarens bedömning av prestationsnivå.

Ingen signifikant skillnad i mjölksyrakoncentrationerna mellan normalpresterande hästar och hästar med nedsatt prestation förelåg i studien, däremot skiljde sig tre av individerna med nedsatt prestation från övriga (data inte redovisat), en hade en stegring av mjölksyra under återhämningsperioden och de två andra hästarna hade betydligt längre halveringstider (30 minuter samt 43 minuter) än resten av hästarna. Då ingen signifikant skillnad förelåg i mjölksyrakoncentration mellan grupperna, och att mjölksyrakoncentrationen visat sig spegla belastningen vid ansträngning (Gottlieb-Vedi *et al.*, 1997), blir min bedömning att ingen direkt skillnad i ansträngningsgrad förelåg mellan grupperna. Vidare förelåg ingen direkt skillnad i mellan grupperna med avseende på puls under arbete (mätt med pulsklocka, data inte redovisade) – pulsmätning är inte helt tillförlitligt vid bedömning av ansträngningsgrad då hästen uppnått maxpuls fortfarande kan öka sin ansträngning utan att hjärtat förmår öka pulsen. Inte heller förelåg en skillnad mellan grupperna med avseende på tiden under vilket arbetstestet genomfördes. Detta bedömer jag allt som allt att inga avsevärda skillnader i ansträngning förelåg mellan grupperna men att några enskilda individer i grupp B (nedsatt prestation) skulle kunna haft en ökad ansträngning med avseende på mjölksyranivåernas förändring efter arbetet. Den individ med en mjölksyrastegring efter arbete hade väldigt jämn andningsfrekvens vid alla mätningar (63-72 andetag per minut) och låg generellt under studiepopulationsmedelvärdet (se figur 1) – de två individer med ökade halveringstider av

mjölksyra avvek även de från studiepopulationsmedelvärdena där de hela tiden låg betydligt högre (data inte redovisade). Detta visar på att ansträngningsgraden har betydelse för andningsfrekvensmönstret efter ansträngning.

En av individerna i studien hade ett tydligt avvikande andningsfrekvensmönster (data inte redovisat) efter ansträngning och låg på samma andningsfrekvens vid 0, 2 och 7 minuter (51 andetag/min) för att vid 11 minuter öka i andningsfrekvens till 69 andetag/minut, denna individ tillhörde gruppen hästar med nedsatt prestation och konstaterades sedan även lida av IAD (häst nummer 19) och detta avvikande andningsmönster kan vara ett tecken på nedsatt lungfunktion och förlångsammad återandning.

Travhästar med nedsatt prestation och både övre och nedre luftvägsproblem har visat sig ha högre mjölksyrakoncentrationer i blodet, högre hjärtfrekvens och lägre arteriellt syretryck jämfört med friska hästar vid samma ansträngningsgrad (Couroucé-Malblanc *et al.*, 2002). Hästar med IAD har visats ha samma mjölksyrekoncentration efter ansträngning av samma grad som friska hästar (Sánchez *et al.*, 2005). Hästar med IAD och lungblödning i kombination med dorsal förskjutning av mjuka gommen (DDSP) har visats ha lägre  $V_4$  jämfört med friska hästar (Couroucé-Malblanc *et al.*, 2010) vilket betyder att hästar med IAD har högre mjölksyrekoncentrationer i blodet vid samma hastighet som friska hästar. Hästar med bara DDSP har visats ha samma  $V_4$  som friska hästar (Couroucé-Malblanc *et al.*, 2010). Sammantaget visar detta på att prestationsnedsättning kan bero på många olika faktorer som samverkar och att mjölksyranivåernas betydelse varierar och inte är helt tillförlitlig som bedömningskriterie av prestationsförmåga.

Nedsatt prestationsförmåga bedömdes i studien inte bero på hjärtsjukdom då ingen av hästarna led av någon hjärtpåverkan; dels var alla normala vid auskultation, EKG-undersökning och dels hade ingen av hästarna förhöjda nivåer av troponin I (cTnI) vilket i sådant fall skulle ha indikerat en hjärtmuskelpåverkan (Nostell *et al.*, 2012; Nostell *et al.*, 2008; Phillips *et al.*, 2003; Slack *et al.*, 2012). Dock kan en del av hästarna med prestationsnedsättning ha nedsatt kapacitet på grund av hältor eller andra problem som inte identifierats då prestationsnedsättning kan vara ett komplext och multifaktoriellt syndrom och inte bara speglar luftvägsproblem.

Andningsfrekvensmönstret efter submaximalt arbete bör i mitt tycke inte användas som en klinisk indikator på nedsatt prestation ännu men skulle möjligen kunna användas som ett tidigt verktyg för att identifiera hästar med subklinisk IAD (se diskussion nedan angående hur andningsfrekvensmönstret påverkas av en ökad slemansamling i luftstrupen). Denna studie är genomförd på ett systematiskt och standardiserat vis och avvikelser från detta tillvägagångssätt bör inte göras vid eventuell tolkning av andningsmönster efter ansträngning då framför allt graden av motion efter avslutat träningspass och graden av ansträngning anses kunna spela en avgörande roll för andningsfrekvensmönstret. För att göra en mer praktiskt tillämpbar utformning av metodiken bör först vidare forskning göras med avseende på de resultat jag framlagt huruvida andningsmönstret skiljer sig efter ansträngning mellan olika grupper av hästar då en stor spridning finns inom grupperna i denna studie.

I denna studie hade hästarna en högre temperaturstegring jämfört med en studie av Gottlieb-Vedi *et al.* (1996) men bland annat tidpunkten för mätning och hastigheten (i genomsnitt 12 m/s i den presenterade studien och 10 m/s i studien av Gottlieb-Vedi *et al.* (1996)) skiljer sig mellan studierna vilket även studiedesignen gör. Det har visats att rektaltemperaturen inte stämmer helt överrens med temperaturen i blodet under ansträngning (Gauvreau *et al.*, 1996) vilket gör att även om det finns en skillnad i temperaturhöjning rektalt mellan

normalpresterande hästar och hästar med nedsatt prestation är den inte absolut betydande för andningen (som mer påverkas av blodets temperatur) men skulle däremot eventuellt kunna användas för bedömning av prestationsförmåga om mer forskning görs inom området. Även om inte rektaltemperaturen och andningsfrekvensen var sammankopplade i denna studie skulle eventuellt ändå den högre temperaturen hos de normalpresterande hästarna kunna ha en liten betydelse på andningsfrekvensen, detta skulle i så fall kunna vara en del av förklaringen av den högre andningsfrekvensen vid tidpunkt 2 och 3 hos de normalpresterande hästarna (se figur 2). Ingen skillnad i rektaltemperatur förelåg mellan grupperna C och D respektive E och F, men dessa grupper bestod av både normalpresterande hästar och hästar med nedsatt prestation, vilket gör att skillnaden som fanns mellan grupp A och B jämnades ut i dessa grupper och detta är anledningen till att ingen skillnad förelåg. En hypotes är att välpresterande hästar använder sina muskler mer effektivt och hårdare, kanske på grund av en ökad aerob kapacitet, och därför får en högre temperaturstegring jämfört med hästar med nedsatt prestation som inte förmår använda sina muskler lika effektivt eventuellt då beroende på en ökad anaerob metabolism.

### **Hur påverkas andningsfrekvensmönstret efter ansträngning av en ökad slemansamling i luftstrupen?**

Det graderingssystem för slemförekomst i luftstrupen som jag använt i studien är validerat av Gerber *et al.* (2004) och slemförekomst anses vara det som bäst indikerar förändringar i luftvägarna (Gerber *et al.*, 2004; Koch *et al.*, 2007) samtidigt som det förekommer små skillnader när olika personer bedömer slemansamling på en häst vid samma tillfälle (Gerber *et al.*, 2004). Mängden slem i luftstrupen varierar normalt inte särskilt mycket under 24 timmar, men hos hästar med IAD (totalt 4) hade 2 stycken en skillnad på 1,7 grader mellan lägsta och högsta värdet i studien av Gerber *et al.* (2004) vid användandet av samma graderingsskala som använts i denna studie.

Alla hästar som det togs ett lungsköljprov på i denna studie hade haft onormal ansamling av slem i luftstrupen. Enligt Gerber *et al.* (2004) så anses flera mindre slemklumpar i luftstrupen vara normalt vilket gör att hästar med en gradering från och med 2 räknas vara onormala. Samtliga av de provtagna hästarna hade IAD enligt den nuvarande definitionen av Couëtil *et al.* (2007) baserat på cytologisk bedömning av lungsköljprovsvätska. Detta tillsammans med resultaten från en studie av Wood *et al.* (2005) där man såg att galopphästar med måttliga till kraftiga mängder slem i luftstrupen till 91,1 % hade IAD medan lindriga slemmängder endast gav diagnosen IAD i 10,4 % av fallen, gör att jag anser det ganska troligt att huvudparten av hästarna i grupp D hade IAD medan huvudparten av hästarna i grupp C inte hade IAD.

Resultaten i denna studie visar att det finns en indikation på att hästar med förmodad IAD har en lägre andningsfrekvens direkt efter avslutad submaximal ansträngning. De har även en större skillnad i andningsfrekvensen 11 minuter senare jämfört med frekvensen direkt efter ansträngning än sina kontroller, dock har grupp C högre andningsfrekvens initialt (se figur 3) och detta utgör den största delen av den föreliggande skillnaden vilket bör tas i beaktande. Detta är det starkaste sambandet, som till stor del kan bero på den signifikanta skillnaden i andningsfrekvens vid tidpunkt 1, som hittades i denna studie avseende andningsfrekvensmönster men tyvärr var det inte kopplat till prestationsförmåga.

Både friska hästar och hästar med lungsjukdom har en återandningsperiod efter ansträngning på 20-40 minuter enligt Hare *et al.* (1998) medan Kusano *et al.* (2008) menar på att hästar med IAD har en längre återhämtning än friska hästar. Hästar med lungsjukdom har högre andningsfrekvens, lägre tidalvolym och ökad kraft per andetag enligt Hare *et al.* (1998) medan annan forskning av Pirrone *et al.* (2005) visar att hästar med IAD under

hyperventilering efter kemisk stimulering har lägre andningsfrekvens, högre tidalvolym och högre motstånd i andningsvägarna. Andningsmotståndet i lungorna sänks hos friska individer vid ökat syrebehov (vid ansträngning) genom vidgning av luftrören vilket ökar ytan över vilket motståndet delas för att underlätta inandning, även genom att öka tidalvolymen minskas andningsmotståndet (Pirrone *et al.*, 2007). Hos hästar med IAD kan vissa delar av lungan vara påverkade med inflammation och luftrörsförträngningar medan andra delar fungerar som hos en frisk individ och detta kan eventuellt förklara att vissa hästar med IAD har normal prestation, kanske är prestationsförmågan beroende på hur utbredda förändringarna är vid IAD men det återstår att kontrollera i framtida studier. Hästar med IAD och nedsatt prestation har visats ha en mer ansträngd andning jämfört med friska hästar, den ökade kraften som krävs för andningen tros ge en högre syreförbrukning i andningsmuskulaturen vilket gör att dessa hästar tidigare når den punkt då en ökning i andning ger ett ökat syrebehov som inte längre täcks av den ökade andningen vilket påverkar prestationsförmågan.

Av de hästar det togs lungsköljprover på tillhörde 2 (50 %) grupp A (prov 9 och 12) och bedöms av tränaren som välpresterande och har goda resultat i tävlingssammanhang både före och efter provtagningstillfället vilket får mig att anse att enbart IAD inte behöver ha någon direkt betydande påverkan på prestationsförmågan. Teoretiskt sett borde välpresterande hästar med IAD ha presterat ännu bättre om de varit friska men den prestationsnedsättande effekten som en ökad lungresistans skulle ge kanske inte betyder tillräckligt mycket vid korta och högintensiva ansträngningar hos hästar med hög aerob kapacitet. Lungpåverkan av hästar som drabbats av IAD och eventuell samtidig prestationsnedsättning är inte fullständigt utredd och då i synnerhet direkt efter ansträngning under fältmässiga förhållanden.

Huruvida slemförekomsten påverkar prestationsförmågan eller inte är svårt att säga med säkerhet. I denna studie sågs en högre slemförekomst 1-3 dagar innan ansträngning i gruppen hästar med nedsatt prestation jämfört med normalpresterande hästar men däremot ingen skillnad efter ansträngning. Travhästar med medelgod till dålig prestation har mer slem i luftvägarna jämfört med välpresterande hästar enligt Richard *et al.* (2010b). Men en ökad slemförekomst behöver inte betyda ett pågående problem utan enligt van Maanen *et al.* (2005) ses efter en infektion med ekvint herpesvirus typ 4 (EHV-4) en sänkt slemelimineringshastighet från luftvägarna i upp till 32 dagar. Man har även sett att efter en infektion med ekvint herpesvirus typ 1 är immunförsvaret i luftvägarna nedsatt i minst 40 dagar med ökad känslighet för nya infektioner och inflammationer i luftvägarna (van Maanen *et al.*, 2005). Galopphästar har visats få en sänkning av immunförsvaret i 24 timmar efter intensiv ansträngning (Mignot *et al.*, 2012) vilket gör dessa individer känsligare för återkommande luftvägsproblem. Saulez *et al.* (2009) förknippade inte nedsatt prestation med ökad slemförekomst i luftstrupen vilket man skulle förvänta sig då ökad slemförekomst ger hypoxi (syrebrist) snabbare vid ansträngning enligt Sánchez *et al.* (2005).

Inflammation i luftvägarna har visats ge en ökning av antalet bägarceller (slemproducerande) och lagrade slempartiklar i de nedre luftvägarna (Lugo *et al.*, 2006) som leder till ökade mängder slem i de nedre luftvägarna. Hos friska hästar har det visats att slem och andra sekretioner normalt elimineras inom 1-2 timmar (Malikides *et al.*, 2007). Slemförekomst i luftstrupen speglar slemförekomsten i de mer distala luftvägarna enligt Koblinger *et al.* (2011) vilket indikerar ett tillstånd av inflammation i de nedre luftvägarna. Avsaknaden av slem i luftstrupen betyder däremot inte att lungorna är friska (Koblinger *et al.*, 2011). Utöver inflammation så påverkar transport av slem från luftvägarna mängden slem i luftstrupen. Friska hästar har visats ha en mukociliär elimineringshastighet (bortforsling av slem och andra sekretioner i luftvägarna) på cirka 2-8 ml/h medan hästar med recurrent airway obstruction (RAO) har visats ha cirka 30 ml/h, hosta ökar elimineringshastigheten och fysisk

aktivitet har visats sänka elimineringshastigheten (Gerber *et al.*, 2004). Slem i de nedre luftvägarna transporteras kontinuerligt mot svalget och hastigheten av slemtransporten bestäms av luftvägsciliernas rörelse, vilken är temperaturberoende, men det har visats att även slemmets egenskaper påverkar slemelimineringshastigheten (genomskinligt slem transporteras fortare) (Gerber *et al.*, 1997).

Att fysisk aktivitet kan sänka slemeliminationen i luftstrupen kan tillsammans med att slem lättare flyttas runt i lungorna vid ansträngning (vilket kan ge en ansamling av slem i luftstrupen härrörande från luftrören) förklara att en ökad slemförekomst sågs efter ansträngning i denna studie, liksom det rapporterats från andra studier enligt Couëttil *et al.* (2007). Flertalet andra faktorer kan spela in på mängden slem i luftstrupen. Mängden slem i luftstrupen har visats minska med stigande ålder hos galopphästar, vilket även sjukdomsperioden med IAD visats göra (Wood *et al.*, 2005). Slem i luftstrupen har visats vara ojämnt fördelat och kan skilja sig i förekomst på olika ställe i luftstrupen (Gerber *et al.*, 1997) vilket gör att en del slem kan ha missats vid endoskopiundersökningen som gjordes i denna studie då ett 1 meter långt endoskop användes och detta är inte tillräckligt för att bedöma hela luftstrupens längd utan endast cirka 2/3.

Koncentrationen av luftburna partiklar har visats kunna påverka slemförekomsten i luftstrupen (Millerick-May *et al.*, 2012) och små partiklar anses vara en viktig orsak till utvecklandet av IAD (Couëttil *et al.*, 2007). Luftburna partiklar har visats variera mellan olika stallar och i samma stall mellan olika månader och skötselrutiner och alla typer av luftburna partiklar har visats minska vid förbättrad ventilation (Millerick-May *et al.*, 2012). Mekaniska barriärer filtrerar bort de flesta partiklar i inandningsluften men en stor andel av de minsta partiklarna når de nedre luftvägarna där de kommer i kontakt med det lokala immunförsvaret i lungorna bestående av bland annat SP-D som spelar en stor roll i lungans immunförsvaret (Forbes *et al.*, 2010).

Det saknas i dagsläget enkla och tillförlitliga metoder för att bedöma andningspåverkan (lungfunktionspåverkan) av subklinisk IAD utan tekniska hjälpmedel men med dessa finns det flera metoder. I vila kan exempelvis impuls oscillometri användas för att upptäcka subkliniska luftvägssjukdomar genom att mäta lungfunktionen, detta kan även användas för att följa behandlingseffekter (Richard *et al.*, 2009). Lägre flöden vid spirometri under senare delen av inandning och utandning hos hästar med prestationsnedsättning tyder på förträngningar i luftvägarna beroende på inflammatoriskt exsudat, dynamisk luftrörskollaps eller hyperreaktiva luftvägar på grund av IAD (Evans *et al.*, 2011). Spirometrimätningar av hästar med nedsatt prestation har visat en nedsatt lungfunktion med lägre gasflöden vilket tyder på en begränsning på andningen men mer undersökningar behövs innan denna metod kan användas i kliniska sammanhang. Resultaten i denna studie indikerar att det i framtiden eventuellt kan bli användbart med mätning av andningsfrekvens efter ansträngning hos varmblodstravare för att identifiera individer med subklinisk IAD.

### **Är surfaktantprotein D koncentrationen i blodet en relevant analysparameter vid utvärdering av nedre luftvägsproblem?**

Resultaten i denna studie skiljer sig avsevärt från resultaten av Richard *et al.* (2012) med avseende på blodkoncentrationen av surfaktantprotein D. I denna studie har samma analysmetod använts som i studien av Richards *et al.* (2012) vid mätning av SP-D. En skillnad är dock att Richard *et al.* använde sig av serum som provmaterial och i den presenterade studien användes plasma. Enligt tillverkaren av analysen (ELISA) skulle användandet av plasma kontra serum ge marginellt lägre koncentrationer av SP-D.

En annan skillnad mellan studierna är att diagnosställande av IAD skedde genom lungsköljprov av Richard *et al.* medan i den presenterade studien användes slem i luftstrupen som en indikation på förmodad IAD. Alla hästar det togs lungsköljprover på i den presenterade studien uppfyller kraven av Couëtil *et al.* (2007) för diagnosställande av IAD vilket gör det ganska sannolika att merparten av hästarna i grupp D hade IAD (varav cirka 30 % har en säker diagnos). Dock skall nämnas att lungsköljproverna togs först 9-13 dagar efter blodprovet för SP-D analys. Exakt hur lång tid SP-D är förhöjt i blodet efter en lungskada är inte fullständigt utrett och de 9-13 dagarna skulle även kunna göra att en, vid provtagning för SP-D, häst fri från IAD hunnit insjukna med IAD vid tidpunkten för lungsköljprovet, dock talar slemansamlingen i luftstrupen för att så inte var fallet utan att luftvägspåverkan fanns vid provtagningen för SP-D. Lungsköljproverna från IAD-hästar i studien av Richard *et al.* hade ökade neutrofilandelar (8-18 %) medan neutrofilandelen var normal (max 4 %) i den presenterade studien, vidare låg mastcellsandelen på 1-3 % i studien av Richard *et al.* medan i den presenterade studien 4-7 % och 3/4 av hästarna i den presenterade studien hade eosinofiler i lungsköljprovet medan ingen av hästarna i studien av Richard *et al.* hade eosinofiler i lungsköljprov. De cytologiska skillnaderna i lungsköljproverna i de båda studierna kan kanske spela roll för SP-D koncentrationerna i blodet men det var inget som sågs i studien av Richard *et al.* där man undersökte om det fanns en koppling mellan serumSP-D och någon typ av inflammatorisk cellandel i lungsköljprov.

Richard *et al.* (2012) använde sig av hästar som skulle undersökas av veterinär på grund av prestationsnedsättning eller uppföljande kontroll medan cirka hälften av hästarna i den presenterade studien var normalpresterande och merparten var kliniskt friska och ingen av dem var kandidater för veterinär undersökning på grund av prestationsnedsättning eller annan orsak vid undersökningstillfället. Den kliniska påverkan av luftvägsproblemen vid ansträngning är inte helt känd i någon av dessa båda studier, dock fanns inte en koppling mellan nedsatt prestation och SP-D koncentrationen i blodet i studierna. I den presenterade studien fanns ingen koppling mellan SP-D och vare sig slemförekomst i luftstrupen eller prestationsförmåga, Richard *et al.* fann heller ingen koppling till prestationsförmågan.

I en studie på galopphästar av Kusano *et al.* (2008) såg man ingen skillnad i SP-D koncentrationer i serum mellan friska hästar och hästar med lungsjukdom, däremot hade hästar med akut lungsjukdom högre koncentrationer av SP-D jämfört med friska hästar vilket även hästar med kraftigare kliniska symtom hade i en studie av Hobo *et al.* (2007) – analysmetoden i deras studie skiljer sig från metoden som användes i denna studie och detta gör att en direkt jämförelse av värdena inte skall göras men förändringar och gruppjämförelser anser jag vara tillförlitliga att göra. Richard *et al.* (2012) uppmätte lägre koncentrationer av SP-D jämfört med de värden som uppmättes i denna studie, värde på över 600 ng/ml förekom och värden på över 150 var inte helt ovanligt i denna studie medan i studien av Richard *et al.* (2012) hade ingen av hästarna med IAD över 150 ng/ml av SP-D i blodet. Drygt hälften av hästarna med IAD i studien av Richard *et al.* (2012) hade SP-D koncentrationer understigande deras gränsvärde 60 ng/ml vilket gör att det inte förefaller särskilt sensitivt för bedömning av IAD, dock presenterade de en sensitivitet på 0,82. Av de hästar som det togs lungsköljprov på i den här studien hade den häst med den minsta cytologiska förändringen högst SP-D koncentration (336,4 ng/ml), de tre övriga hade låga nivåer (<54 ng/ml).

Det mest uppseendeväckande vid en jämförelse av den här studien med studien av Richard *et al.* (2012) är att alla hästar som inte hade IAD i studien av Richard *et al.* hade koncentrationer av SP-D under 60 ng/ml och att en skillnad i koncentrationen av SP-D i blodet förelåg mellan kontrollhästar och IAD-hästar. Ingen skillnad i SP-D koncentrationen i blodet förelåg mellan någon av de två grupperingar som gjordes i den presenterade studien, dock hade de hästar



med mer slem i luftstrupen (grupp D) något högre medelvärde än hästarna med normal slemförekomst i luftstrupen (grupp C) men spridningen inom grupp D var stor och ingen statistisk skillnad förelåg vid gruppjämförelsen, och de förmodat friska hästarna i min studie hade SP-D koncentrationer överstigande 60 ng/ml.

Sammantaget blir min bedömning att SP-D koncentrationen inte behöver vara förhöjd under hela sjukdomsförloppet vid IAD och det gör det i så fall svårt att säkert bedöma inflammationstillstånd i lungorna med endast användning av SP-D mätning. Analys av SP-D i blodet för att bedöma prestation anses inte vara kliniskt användbart i dagsläget, i de två studier som nu gjorts på varmbloodstravare med subklinisk IAD (den här presenterade studien samt studien av Richard *et al.*, 2012) fann man ingen koppling mellan SP-D i blodet och prestation. Värdet av analys av enbart SP-D i blodet för diagnostisering av IAD hos varmbloodiga travhästar kan inte anses vara användbart i dagsläget då de två studierna ger olika resultat och mer forskning behövs för att korrekt bedöma värdet av SP-D i blodet som indikator för IAD.

## **SLUTSATS**

Andningsfrekvensmönstret efter arbete kan vara svårt att praktiskt använda sig av vid bedömning av prestationsförmåga enligt metoden som använts i försöket då rutinerna i travstall skiljer sig från studiedesignen vilket man bör ha i åtanke. Andningsfrekvensmönstret hos individer med ökad slemförekomst i luftstrupen, förmodad subklinisk IAD, kan gå att skilja från de med normala mängder slem efter ansträngning men det överrensstämmer inte helt med deras prestationsförmåga enligt tränarens bedömning och det finns en stor individuell variation.

Den andra parameter som bedöms kunna vara kliniskt relevant är skillnaden i andningsfrekvens direkt efter arbete jämfört med andningsfrekvensen 11 minuter senare vilken, om en stor skillnad indikerar subkliniska luftvägsproblem vilket är min teori, kan underlätta tidigt diagnosställande av subkliniska luftvägssjukdomar och denna mätning kan med fördel göras av annan person än en veterinär. Fler studier med större individantal behövs för att utvärdera hur andningsfrekvensmönstret skiljer sig mellan olika grupper av hästar innan klinisk relevans anses vara bestyrkt. Hästar med avvikande andningsfrekvensmönster från figur 1 anser jag kunna ha en försämrad lungfunktion och bedömer därför det som en potentiell indikation på nedsatt prestation. För att utvärdera huruvida SP-D är en relevant analys vid diagnostisering av IAD krävs mer forskning, mina resultat och andras är inte helt överrensstämmande och en direkt effekt på prestationsförmågan saknas i alla hittills gjorda studier vilket gör det mindre värdefullt vid enbart prestationsbedömning.

## **Tack till**

Ett stort tack riktas till travtränarna, hästkötarna och all annan personal på travanläggningen som varit inblandade i arbetet under studien – utan er hade inget av detta varit möjligt. Tack även till hästägarna för att hästarna fick delta i studien samt till personal på SLU som på något vis har hjälpt till under arbetets gång.

## REFERENSER

- Buhl, R. (2010) Valvular regurgitations in the horse: The importance of an exercise ECG. *The Veterinary Journal* 183, 117-118.
- Buhl, R. & Ersboll, A. K. (2012) Echocardiographic evaluation of changes in left ventricular size and valvular regurgitation associated with physical training during and after maturity in Standardbred trotters. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 240, 205-212.
- Cardwell, J.M., Christley, R. M., Gerber, V., Malikides, N., Wood, J. L. N., Newton, J. R. & Hodgson, J. L. (2011) What's in a name? Inflammatory airway disease in racehorses in training. *Equine Veterinary Journal* 43, 756-758.
- Christmann, U., Livesey, L. C., Taintor, J. S., Waldrige, B. M., Schumacher, J., Grier, B. L. & Hite, R. D. (2006) Lung Surfactant Function and Composition in Neonatal Foals and Adult Horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 20, 1402-1407.
- Christmann, U., Hite, R.D., Witonsky, S.G., Elvinger, F., Werre, S.R., Thatcher, C.D., Tan, R.H.H. & Buechner-Maxwell, V.A. (2009) Influence of Age on Surfactant Isolated from Healthy Horses Maintained on Pasture. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 23, 612-618.
- Christmann, U., Hite, R. D., Tan, R. H. H., Thatcher, C. D., Witonsky, S. G., Werre, S. R. & Buechner-Maxwell, V. A. (2010) Surfactant alterations in horses with recurrent airway obstruction at various clinical stages. *American Journal of Veterinary Research* 71, 468-475.
- Costa, M.F.M., Ronchi, F.A., Ivanow, A., Carmona, A.K., Casarini, D. & Slocombe, R.F. (2011) Association between circulating angiotensin-converting enzyme and exercise-induced pulmonary haemorrhage in Thoroughbred racehorses. *Research in Veterinary Science* doi:10.1016/j.rvsc.2011.10.011
- Couëttil, L.L., Hoffman, A.M., Buechner-Maxwell, V., Viel, L., Wood, J.L.N. & Lavoie, J.P. (2007) Inflammatory Airway Disease of Horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 21, 356-361.
- Couroucé, A., Chatard, J. C. & Auvinet, B. (1997) Estimation of performance potential of Standardbred trotters from blood lactate concentrations measured in field conditions. *Equine Veterinary Journal* 29, 365-369.
- Couroucé-Malblanc, A., Pronost, S., Fortier, G., Corde, R. & Rossignol, F. (2002) Physiological measurements and upper and lower respiratory tract evaluation in French Standardbred Trotters during a standardised exercise test on the treadmill. *Equine Veterinary Journal*, 402-407.
- Couroucé-Malblanc, A., Deniau, V., Rossignol, F., Corde, R., Leleu, C., Maillard, K., Pitel, P.H., Pronost, S. & Fortier, G. (2010) Physiological measurements and prevalence of lower airway diseases in Trotters with dorsal displacement of the soft palate. *Equine Veterinary Journal* 42, 246-255.
- Dart, A. J., Dowling, B. A. & Smith, C. L. (2005) Upper Airway Dysfunction Associated with Collapse of the Apex of the Corniculate Process of the Left Arytenoid Cartilage During Exercise in 15 Horses. *Veterinary Surgery* 34, 543-547.
- de Graaf-Roelfsema, E., Veldhuis, P. P., Keizer, H. A., van Ginneken, M. M. E., van Dam, K. G., Johnson, M. L., Barneveld, A., Menheere, P. P. C. A, van Breda, E. & Wijnberg, I. D. (2009) Overtrained horses alter their resting pulsatile growth hormone secretion. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 297, 403-411.
- de Graaf-Roelfsema, E., Keizer, H. A., Wijnberg, I. D. & van der Kolk, J. H. (2010) The incidence and severity of gastric ulceration does not increase in overtrained Standardbred horses. *Equine Veterinary Journal* 42, 58-61.
- Desmaizieres, L.M., Serraud, N., Plainfosse, B., Michel, A. & Tamzali, Y. (2009) Dynamic respiratory endoscopy without treadmill in 68 performance Standardbred, Thoroughbred and saddle horses under natural training conditions. *Equine Veterinary Journal* 41, 347-352.
- Evans, D.L., Kiddell, L. & Smith, C.L. (2011) Pulmonary function measurements immediately after exercise are correlated with neutrophil percentage in tracheal aspirates in horses with poor racing

- performance. *Research in Veterinary Science* 90, 510-515.
- Fazio, F., Assenza, A., Tosto, F., Casella, S., Piccione, G. & Caola, G. (2011) Training and haematochemical profile in Thoroughbreds and Standardbreds: A longitudinal study. *Livestock Science* 141, 221-226.
- Fog, P., Vigre, H. & Nielsen, M. K. (2011) Strongyle egg counts in Standardbred trotters: Are they associated with race performance? *Equine Veterinary Journal* 43, 89-92.
- Forbes, L. R. & Haczku, A. (2010) SP-D and regulation of the pulmonary innate system in allergic airway changes. *Clinical Et Experimental Allergy* 40, 547-562.
- Gauvreau, G. M., Staempfli, H., McCutcheon, L. J., Young, S. S. & McDonell, W. N. (1995) Comparison of aerobic capacity between racing standardbred horses. *Journal of Applied Physiology* 78, 1447-1451.
- Gauvreau, G. M., Young, S. S., Staempfli, H., McCutcheon, L. J., Wilson, B. A. & McDonell, W. N. (1996) The relationship between respiratory exchange ratio, plasma lactate and muscle lactate concentrations in exercising horses using a valved gas collection system. *Canadian Journal of Veterinary Research* 60, 161-171.
- Gerber, V., Gehr, P., Straub, R., Frenz, M., King, M. & Im Hof, V. (1997) Mucus quality on horse tracheal epithelium: microscopic grading based on transparency. *Respiration Physiology* 107, 67-74.
- Gerber, V., Robinson, N. E., Luethi, S., Marti, E., Wampfler, B. & Straub, R. (2003) Airway inflammation and mucus in two age groups of asymptomatic well-performing sport horses. *Equine Veterinary Journal* 35, 491-495.
- Gerber, V., Straub, R., Marti, E., Hauptman, J., Herholz, C., King, M., Imhof, A., Tahon, L. & Robinson, N. E. (2004) Endoscopic scoring of mucus quantity and quality: observer and horse variance and relationship to inflammation, mucus viscoelasticity and volume. *Equine Veterinary Journal* 36, 576-582.
- Golland, L.C., Evans, D.L., McGowan, C.M., Hodgson, D.R. & Rose, R.J. (2003) The effects of Overtraining on Blood Volumes in Standardbred Racehorses. *The Veterinary Journal* 165, 228-233.
- Gottlieb-Vedi, M. & Lindholm, A. (1997) Comparison of standardbred trotters exercising on a treadmill and a race track with identical draught resistances. *Veterinary Record* 140, 525-528.
- Haczku, A. (2008) Protective role of the lung collectins surfactant protein A and surfactant protein D in airway inflammation. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 122, 861-879.
- Hamlin, M. J., Shearman, J. P. & Hopkins, W. G. (2002) Changes in physiological parameters in overtrained Standardbred racehorses. *Equine Veterinary Journal* 34, 383-388.
- Hare, J. E. & Viel, L. (1998) Pulmonary Eosinophilia Associated with Increased Airway Responsiveness in Young Racing Horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 12, 163-170.
- Hobo, S., Yoshihara, T., Oikawa, M. & Jones, J. H. (2001) Surfactant proteins in bronchoalveolar lavage fluid of horses: assay technique and changes following road transport. *Veterinary Record* 148, 74-80.
- Hobo, S., Niwa, H. & Anzai, T. (2007) Evaluation of Serum Amyloid A and Surfactant Protein D in Sera for Identification of the Clinical Condition of Horses with Bacterial Pneumonia. *The Journal of Veterinary Medical Science* 69, 827-830.
- Holcombe, S. J., Robinson, N. E., Derksen, F. J., Bertold B., Genovese, R., Miller, R., De Feiter Rupp, H., Carr, E. A., Eberhart, S. W., Boruta, D. & Kaneene, J. B. (2006) Effect of tracheal mucus and tracheal cytology on racing performance in Thoroughbred racehorses. *Equine Veterinary Journal* 38, 300-304.
- Hughes, K.J., Malikides, N., Hodgson, D.R. & Hodgson, J.L (2003) Comparison of tracheal aspirates and bronchoalveolar lavage in racehorses 1. Evaluation of cytological stains and the percentage of mast cells and eosinophils. *Australian Veterinary Journal* 81, 681-684.
- Im Hof, V., Gehr, P., Gerber, V., Lee, M.M. & Schürch, S. (1997) In vivo determination of surface tension in the horse trachea and in vitro model studies. *Respiration Physiology* 109, 81-93.
- Jagric, M. S., Nemeč, S. A., Zrimsek, P., Kramarić, P., Kos, K. V., Vovk, T. & Kobal, S. (2012) Plasma

- malondialdehyde, biochemical and haematological parameters in standardbred horses during a selected field exercise test. *Acta Veterinaria (Beograd)* 62, 53-65.
- Jonsson, H. & Egenvall, A. (2006) Prevalence of gastric ulceration in Swedish Standardbreds in race training. *Equine Veterinary Journal* 38, 209-213.
- Kankavi, O., Ata, A. & Ciftcioglu, M. A. (2006) Surfactant protein A and D in the reproductive tract of stallion. *Theriogenology* 66, 1057-1064.
- Kinnunen, S., Hyypä, S., Lappalainen, J., Oksala, N., Venojärvi, M., Nakao, C., Hänninen, O., Sen, C. K. & Atalay, M. (2005) Exercise-induced oxidative stress and muscle stress protein responses in trotters. *European Journal of Applied Physiology* 93, 496-501.
- Knight, P.K. & Evans, D.L. (2000) Clinical abnormalities detected in post-race examinations of poorly performing Standardbreds. *Australian Veterinary Journal* 78, 344-346.
- Koblinger, K., Nicol, J., McDonald, K., Wasko, A., Logie, N., Weiss, M. & Léguillette, R. (2011) Endoscopic Assessment of Airway Inflammation in Horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 25, 1118-1126.
- Koch, C., Straub, R., Ramseyer, A., Widmer, A., Robinson, N. E. & Gerber, V. (2007) Endoscopic scoring of the tracheal septum in horses and its clinical relevance for the evaluation of lower airway health in horses. *Equine Veterinary Journal* 39, 107-112.
- Kusano, K., Hobo, S., Ode, H. & Ishikawa, Y. (2008) Tracheal Endoscopic and Cytological Findings and Blood Examination Results in Thoroughbred Racehorses Suspected to have Lower Respiratory Tract Disease. *Journal of Equine Veterinary Science* 19, 97-102.
- Laus, F., Attili, A.R., Cerquetella, M., Spaterna, A., Tesi, B. & Cuteri, V. (2009) Endoscopic findings, microbiological and cytological evaluation of tracheal aspirates in a population of Standardbred horses with poor performance. *Veterinarni Medicina* 54, 444-450.
- Lavoie, J.P., Cesarini, C., Lavoie-Lamoureux, A., Moran, K., Lutz, S., Picandet, V., Jean, D. & Marcoux, M. (2011) Bronchoalveolar Lavage Fluid Cytology and Cytokine Messenger Ribonucleic Acid Expression of Racehorses with Exercise Intolerance and Lower Airway Inflammation. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 25, 322-329.
- Leleu, C., Cotrel, C. & Barrey, E. (2005a) Relationships between biomechanical variables and race performance in French Standardbred trotters. *Livestock Production Science* 92, 39-46.
- Leleu, C., Cotrel, C. & Couroucé-Malblanc, A. (2005b) Relationships between physiological variables and race performance in French standardbred trotters. *Veterinary Record* 156, 339-342.
- Lindner, A. E. (2010) Relationships between racing times of Standardbreds and  $V_4$  and  $V_{200}$ . *Journal of Animal Science* 88, 950-954.
- Lugo, J., Harkema, J. R., deFeijter-Rupp, H., Bartner, L., Boruta, D. & Robinson, N. E. (2006) Airway inflammation is associated with mucous cell metaplasia and increased intraepithelial stored mucosubstances in horses. *The Veterinary Journal* 172, 293-301.
- Malikides, N., Hughes, K.J., Hodgson, D.R. & Hodgson, J.L. (2003) Comparison of tracheal aspirates and bronchoalveolar lavage in racehorses 2. Evaluation of the diagnostic significance of neutrophil percentage. *Australian Veterinary Journal* 81, 685-687.
- Malikides, N., Hughes, K.J. & Hodgson, J.L. (2007) Comparison of tracheal aspirates before and after high-speed treadmill exercise in racehorses. *Australian Veterinary Journal* 85, 414-419.
- McKane, S. A. & Slocombe, R. F. (2010) Experimental mild pulmonary inflammation promotes development of exercise-induced pulmonary haemorrhage. *Equine Veterinary Journal* 42, 235-239.
- McKeever, K. H. (2003) Overtraining Syndrome in Standardbred Horses: New Insights into the Role of Red Blood Cell Hypervolaemia. *The Veterinary Journal* 165, 190-192.
- Mignot, C. C., Pirottin, D., Farnir, F., de Moffarts, B., Molitor, C., Lekeux, P. & Art, T. (2012) Effect of strenuous exercise and ex vivo TLR3 and TLR4 stimulation on inflammatory gene expression in equine

- pulmonary leukocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 147, 127-135.
- Millerick-May, M L., Karmaus, W., Derksen, F. J., Berthold, B., Holcombe, S. J. & Robinson, N. E. (2012) Local airborne particulate concentration is associate with visible tracheal mucus in Thoroughbred racehorses. *Equine Veterinary Journal* doi: 10.1111/j.2042-3306.2012.00568.x
- Moore, B. R., Krakowka, S., Cummins, J. M. & Robertson, J. T. (1996) Changes in airway inflammatory cell populations in Standardbred racehorses after interferon-alpha administration. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 49, 347-358.
- Moore, B. R., Krakowka, S., Mcvey, D. S., Cummins, J. M. & Robertson, J. T (1997) Inflammatory markers in bronchoalveolar lavage fluid of Standardbred racehorses with inflammatory airway disease: response to interferon-alpha. *Equine Veterinary Journal* 29, 142-147.
- Mykkänen, A. K., Pösö, A. R., McGowan, C. M. & McKane, S. A. (2010) Expression of lactate transporters MCT1, MCT2 and CD147 in the red blood cells of three horse breeds: Finnhorse, Standardbred and Thoroughbred. *Equine Veterinary Journal* 42, 161-166.
- Nostell, K. & Häggström, J. (2008) Resting concentrations of cardiac troponin I in fit horses and effect of racing. *Journal of Veterinary Cardiology* 10, 105-109.
- Nostell, K., Bröjer, J., Höglund, K., Edner, A. & Häggström, J. (2012) Cardiac troponin I and the occurrence of cardiac arrhythmias in horses with experimentally induced endotoxaemia. *The Veterinary Journal* 192, 171-175.
- Phillips, W., Giguère, S., Franklin, R. P., Hernandez, J., Adin, D. & Peloso, J. G. (2003) Cardiac Troponin I in Pastured and Race-Training Thoroughbred Horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 17, 597-599.
- Physick-Shaerd, P.W. & McGurrin, M.K.J. (2010) Ventricular Arrhythmias during Race Recovery in Standardbred Racehorses and Associations with Autonomic Activity. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 24, 1158-1166.
- Pirrone, F., Albertini, M., Clement, M. G. & Lafortuna, C. L. (2007) Respiratory mechanics in Standardbred horses with sub-clinical inflammatory airway disease and poor athletic performance. *The Veterinary Journal* 173, 144-150.
- Priest, D. T., Cheetham, J., Regner, A. L., Mitchell, L., Soderholm, L. V., Tamzali, Y. & Ducharme, N. G. (2012) Dynamic respiratory endoscopy of Standardbred racehorses during qualifying races. *Equine Veterinary Journal* doi: 10.1111/j.2042-3306.2012.00562.x
- Ramzan, P. H. L., Parkin, T. D. H. & Shepherd, M. C. (2008) Lower respiratory tract disease in Thoroughbred racehorses: Analysis of endoscopic data from a UK training yard. *Equine Veterinary Journal* 40, 7-13.
- Piccione, G., Fazio, F. & Giudice, E. (2007) Oxidative stress in standardbred horses during official races of 1600 and 2000 meters. *Medycyna Weterynaryjna* 63, 1554-1557.
- Richard, E. A., Fortier, G. D., Denoix, J.M., Art, T., Lekeux, P. M. & Van Erck, E. (2009) Influence of subclinical inflammatory airway disease on equine respiratory function evaluated by impulse oscillometry. *Equine Veterinary Journal* 41, 384-389.
- Richard, E. A., Fortier, G. D., Lekeux, P. M. & Van Erck, E. (2010a) Laboratory findings in respiratory fluids of the poorly-performing horse. *The Veterinary Journal* 185, 115-122.
- Richard, E. A., Fortier, G. D., Pitel, P.H., Dupuis, M.C., Valette, J.P., Art, T., Denoix, J.M., Lekeux, P. M. & Van Erck, E. (2010b) Sub-clinical diseases affecting performance in Standardbred trotters: Diagnostic methods and predictive parameters. *The Veterinary Journal* 184, 282-289.
- Richard, E. A., Pitel, P.H., Christmann, U., Lekeux, P., Fortier, G. & Pronost, S. (2012) Serum concentrations of surfactant protein D in horses with lower airway inflammation. *Equine Veterinary Journal* 44, 277-281.
- Riihimäki, M., Lilliehök, I., Raine, A., Berg, M. & Pringle, J. (2008) Clinical alterations and mRNA levels of IL-4 and IL-5 in bronchoalveolar cells of horses with transient pulmonary eosinophilia. *Research in*

*Veterinary Science* 85, 52-55.

- Ross, M. W. (2011) Lameness in the standardbred racehorse. *NAVC Conference 2011*.
- Sánchez, A., Couëtil, L.L., Ward, M.P. & Clark, S.P. (2005) Effect of Airway Disease on Blood Gas Exchange in Racehorses. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 19, 87-92.
- Saulez, M. N. & Gummow, B. (2009) Prevalence of pharyngeal, laryngeal and tracheal disorders in thoroughbred racehorses, and effect on performance. *Veterinary Record* 165, 431-435.
- Slack, J., Boston, R.C., Soma, L. & Reef, V.B. (2012) Cardiac Troponin I in Racing Standardbreds. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 26, 1202-1208.
- Sorensen, G. L., Husby, S. & Holmskov, U. (2007) Surfactant protein A and surfactant protein D in pulmonary disease. *Immunobiology* 212, 381-416.
- Van Maanen, C., Heldens, J., Cullinane, A., van den Hoven, R. & Weststrate, M. (2005) The prevalence of antibodies against equine influenza virus, equine herpesvirus 1 and 4, equine arteritis virus and equine rhinovirus 1 and 2 in Dutch standardbred horses. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 74, 140-145.
- Votion, D.M., Gnaiger, E., Lemieux, H., Mouithys-Mickalad, A. & Serteyn, D. (2012) Physical Fitness and Mitochondrial Respiratory Capacity in Horse Skeletal Muscle. *PLoS ONE* 7, e34890. doi: 10.1371/journal.pone.0034890
- Widmer, A., Doherr, M.G., Tessier, C., Koch, C., Ramseyer, A., Straub, R. & Gerber, V. (2009) Association of increased tracheal mucus accumulation with poor willingness to perform in show-jumpers and dressage horses. *The Veterinary Journal* 182, 430-435.
- Wijnberg, I D., van Dam, K. G., de Graaf-Roelfsema, E., Keizer, H. A., van Ginneken, M. M. E., Barneveld, A., van Breda, E. & van der Kolk, J. H. (2008) (Over)training effects on quantitative electromyography and muscle enzyme activities in standardbred horses. *Journal of Applied Physiology* 105, 1746-1753.
- Wood, J. L. N., Newton, J. R., Chanter, N. & Mumford, J. A. (2005) Inflammatory airway disease, nasal discharge and respiratory infections in young British racehorses. *Equine Veterinary Journal* 37, 236-242.
- Zucca, E., Ferrucci, F., Stancari, G., Saporiti, T. & Ferro, E. (2010) The prevalence of Cardiac Murmurs among Standardbred Racehorses Presented with Poor Performance. *The Journal of Veterinary Medical Science* 72, 781-785.