

**Aus der Klinik für Pferde
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

**Überprüfung der Zuverlässigkeit der zytologischen Untersuchung
von Tracheobronchialsekret und Bronchoalveolärer Lavage
als Mittel zur Diagnosestellung von equinem Asthma**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Paula Julia Pöhlig
aus Stade**

**Berlin 2024
Journal-Nr.: 4442**

Aus der Klinik für Pferde
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Überprüfung der Zuverlässigkeit der zytologischen Untersuchung von
Tracheobronchialsekret und Bronchoalveolärer Lavage
als Mittel zur Diagnosestellung von equinem Asthma**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Paula Julia Pöhlig
aus Stade

Berlin 2024
Journal-Nr.: 4442

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Gehlen
Zweiter Gutachter: PD Dr. Lars Mundhenk
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Kerstin E. Müller

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):
horses, asthma, diagnostic techniques, therapeutic irrigation (MeSH),
bronchoalveolar lavage, cytology

Tag der Promotion: 24.04.2024

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-96729-243-5

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2024

Dissertation, Freie Universität Berlin

D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2024 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht.....	3
2.1 Terminologie.....	3
2.2 Prävalenz.....	3
2.3 Ätiologie.....	4
2.4 Immunologische Situation und die Rolle der neutrophilen Granulozyten bei der Entzündungsreaktion.....	6
2.5 Pathogenese.....	8
2.6 Klinische Symptome.....	11
2.7 Diagnostik.....	12
2.7.1 Bronchoskopie und Probenentnahme.....	12
2.7.1.1 Indikationen für die Entnahme von TBS und BAL.....	12
2.7.1.2 Entnahme von Tracheobronchialsekret.....	12
2.7.1.3 Durchführung der Bronchoalveolären Lavage.....	14
2.7.2 Probenbearbeitung und Fehlerquellen.....	16
2.7.2.1 Zeit bis zur Probenbearbeitung.....	16
2.7.2.2 Zentrifugation der Proben.....	18
2.7.2.3 Ausstrichmethode, Fixierung und Trocknung der Proben.....	20
2.7.2.4 Färbung der Ausstriche.....	23
2.7.3 Vorgehen bei der zytologischen Untersuchung – Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.....	26
2.7.4 Zytologische Befunde in TBS- und BAL-Ausstrichen.....	29
2.7.5 Einflüsse auf die zytologischen Ergebnisse - Probenentnahme und weitere Einflüsse....	40
2.8 Zytologische Verdachtsdiagnosen und Zusammenhang zytologischer Ergebnisse mit klinischen Symptomen.....	45
3 Material und Methoden	49
3.1 Ziele der Studie.....	49
3.1.1 Vorgehen.....	49
3.2 Patienten.....	50
3.2.1 Vorbericht und Signalement.....	50
3.2.2 Klinische Untersuchung.....	51
3.2.3 Arterielle Blutgasanalyse.....	51
3.2.4 Blutanalyse.....	52
3.2.5 Bronchoskopie.....	52
3.2.6 Bronchoalveoläre Lavage.....	53
3.3 Labordiagnostische Untersuchungen.....	54
3.3.1 Bearbeitung der Proben.....	54
3.3.2 Färbung und Trocknung.....	54
3.3.3 Zytologische Analyse von TBS und BAL in der Klinik für Pferde.....	55
3.4 Diagnosestellung und Einteilung der Studienpferde.....	55
3.5 Überprüfung der intra- und interindividuellen Varianz zytologischer Ergebnisse.....	57
3.5.1 Auswahl und Angebot der Labore.....	57

Inhaltsverzeichnis

3.5.2	Aufteilung der Proben und Versand	59
3.5.3	Verblindete, zytologische Untersuchung in der Klinik für Pferde	61
3.5.4	Befundung der Fremdlabore.....	63
3.5.5	Intraindividuelle Varianz der Ergebnisse	64
3.5.6	Interindividuelle Varianz der Ergebnisse	65
3.6	<i>Erstellung eines vereinheitlichten Scoring Systems zur zytologischen Untersuchung</i>	<i>70</i>
4	Statistik.....	77
5	Ergebnisse	81
5.1	<i>Ergebnisse der Atemwegsuntersuchungen und Diagnosestellung in der Klinik für Pferde ..</i>	<i>81</i>
5.1.1	Lungengesunde Pferde	81
5.1.2	Pferde mit mildem bis moderatem equinem Asthma.....	81
5.1.3	Pferde mit schwerem equinem Asthma.....	82
5.2	<i>Ergebnisse der Untersuchungsbefunde der Labore.....</i>	<i>84</i>
5.3	<i>Ergebnis der intraindividuellen Varianz</i>	<i>85</i>
5.3.1	Ergebnis der intraindividuellen Varianz in der Klinik für Pferde	86
5.3.2	Ergebnisse der intraindividuellen Varianz der Fremdlabore	94
5.4	<i>Ergebnisse der interindividuellen Varianz</i>	<i>106</i>
5.5	<i>Ergebnisse zytologischer Diagnosen</i>	<i>112</i>
5.5.1	Ergebnisse der zytologischen Diagnosen durch die Untersucher der Klinik für Pferde..	112
5.5.1.1	Lungengesunde Pferde	112
5.5.1.2	Pferde mit mildem-moderatem Asthma	113
5.5.1.3	Pferde mit schwerem equinem Asthma.....	113
5.5.2	Ergebnisse der zytologischen Diagnosen durch die Fremdlabore.....	114
5.5.2.1	Lungengesunde Pferde	114
5.5.2.2	Pferde mit mildem bis moderaten equinem Asthma.....	115
5.5.2.3	Pferde mit schwerem equinem Asthma.....	117
6	Diskussion.....	123
6.1	<i>Diskussion über Einflüsse auf die zytologischen Ergebnisse</i>	<i>123</i>
6.1.1	Diskussion über die Probenentnahme	123
6.1.2	Diskussion der Probenbearbeitung	124
6.1.3	Diskussion über weitere Einflüsse.....	125
6.2	<i>Diskussion über die intraindividuelle Varianz zytologischer Ergebnisse.....</i>	<i>127</i>
6.3	<i>Diskussion der Beurteilung verschiedener Labore.....</i>	<i>133</i>
6.4	<i>Diskussion über die interindividuelle Varianz zytologischer Ergebnisse.....</i>	<i>134</i>
6.5	<i>Diskussion über die Befunde und Befundinterpretationen der Labore.....</i>	<i>136</i>
6.6	<i>Diskussion über den Zusammenhang klinischer Symptome und zytologischer Befunde...</i>	<i>139</i>
6.7	<i>Schlussfolgerung und Ausblick.....</i>	<i>140</i>
7	Zusammenfassung.....	143
8	Summary	145
9	Literaturverzeichnis	147
10	Anhang	163
11	Danksagung	198
12	Interessenskonflikte.....	198
13	Selbstständigkeitserklärung	199

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zytologiebild BAL: Phagozytose einer Polle (P) durch einen mehrkernigen Makrophagen (mM).	34
Abbildung 2: Zytologiebild BAL: Mukusstränge (S), schaumiger Alveolarmakrophage (SM), Lymphozyt (L).....	35
Abbildung 3: Zytologiebild BAL: hochgradig neutrophile Granulozyten (N).	36
Abbildung 4: Zytologiebild TBS: eosinophiler Granulozyt (E), außerdem Mukusstränge (S), Alveolarmakrophagen (M) und Lymphozyten (L).	37
Abbildung 5: Zytologiebild TBS: Curschmannspirale (C).	39
Abbildung 6: Zytologiebild BAL: Mukusstrang (S), mehrkerniger Makrophage (mM).....	40
Abbildung 7: Aufteilung der Ausstriche von TBS und BAL beispielhaft an einem Pferd, US: Untersucher.....	60
Abbildung 8: Intraindividuelle Varianz: Ergebnisse zu neutrophilen Granulozyten in der BAL von Labor 5 Untersucher A zu allen 15 Pferden.	87
Abbildung 9: Intraindividuelle Varianz: Ergebnisse zu Makrophagen in der BAL von Labor 5 Untersucher A zu allen 15 Pferden.	87
Abbildung 10: Intraindividuelle Übereinstimmung der Ergebnisse von Untersucher A zu verschiedenen Parametern in der BAL.	89
Abbildung 11: Intraindividuelle Übereinstimmung der Ergebnisse von Untersucher A zu verschiedenen Parametern im TBS.	89
Abbildung 12: Intraindividuelle Varianz: Ergebnisse zu neutrophilen Granulozyten in der BAL von Labor 5 Untersucher B zu allen 15 Pferden.	90
Abbildung 13: Intraindividuelle Varianz: Ergebnisse zu eosinophilen Granulozyten in der BAL von Labor 5 Untersucher B zu allen 15 Pferden.	91
Abbildung 14: Intraindividuelle Varianz: Ergebnisse zu Curschmannspiralen im TBS von Labor 5 Untersucher B zu allen 15 Pferden, semiquantitative Angaben beruhen auf den Befundbögen von Labor 5.	91
Abbildung 15: Intraindividuelle Varianz: Ergebnisse zu Makrophagen im TBS von Labor 5 Untersucher B zu allen 15 Pferden, semiquantitative Angaben beruhen auf den Befundbögen von Labor 5.	92
Abbildung 16: Intraindividuelle Übereinstimmung der Ergebnisse von Untersucher B zu verschiedenen Parametern in der BAL.	93

Abbildung 17: Intraindividuelle Übereinstimmung der Ergebnisse von Untersucher B zu verschiedenen Parametern im TBS.	94
Abbildung 18: Intraindividuelle Varianz: Ergebnisse zu neutrophilen Granulozyten im TBS von Labor 1 zu allen 15 Pferden, semiquantitative Angaben beruhen auf den Befundbögen von Labor 1.	95
Abbildung 19: Intraindividuelle Übereinstimmung der Ergebnisse von Labor 1 zu verschiedenen Parametern in der BAL.	96
Abbildung 20: Intraindividuelle Übereinstimmung der Ergebnisse von Labor 1 zu verschiedenen Parametern in der TBS.	97
Abbildung 21: Intraindividuelle Varianz: Ergebnisse zu Makrophagen in der BAL von Labor 2 zu allen 15 Pferden, semiquantitative Angaben beruhen auf den Befundbögen von Labor 2.	98
Abbildung 22: Intraindividuelle Varianz: Ergebnisse zu neutrophilen Granulozyten im TBS von Labor 2 zu allen 15 Pferden, semiquantitative Angaben beruhen auf den Befundbögen von Labor 2.	98
Abbildung 23: Intraindividuelle Varianz: Ergebnisse zu Curschmannspiralen im TBS von Labor 2 zu allen 15 Pferden, semiquantitative Angaben beruhen auf den Befundbögen von Labor 2.	99
Abbildung 24: Intraindividuelle Übereinstimmung der Ergebnisse von Labor 2 zu verschiedenen Parametern in der BAL.	100
Abbildung 25: Intraindividuelle Übereinstimmung der Ergebnisse von Labor 2 zu verschiedenen Parametern im TBS.	100
Abbildung 26: Intraindividuelle Varianz: Ergebnisse zu neutrophilen Granulozyten in der BAL von Labor 3 zu allen 15 Pferden.	101
Abbildung 27: Intraindividuelle Varianz: Ergebnisse zu Makrophagen in der BAL von Labor 3 zu allen 15 Pferden.	102
Abbildung 28: Intraindividuelle Übereinstimmung der Ergebnisse von Labor 3 zu verschiedenen Parametern in der BAL.	103
Abbildung 29: Intraindividuelle Übereinstimmung der Ergebnisse von Labor 3 zu verschiedenen Parametern im TBS.	103

Abbildung 30: Intraindividuelle Varianz: Ergebnisse zu Lymphozyten in der BAL oder TBS (keine Angabe welche Probe) von Labor 4 zu allen 15 Pferden.	104
Abbildung 31: Intraindividuelle Übereinstimmung der Ergebnisse von Labor 4 zu verschiedenen Parametern in der BAL oder im TBS.	105
Abbildung 32: Interindividueller Vergleich der Ergebnisse zu neutrophilen Granulozyten in der BAL aller Labore bzw. Untersucher zu den gesunden Pferden.	107
Abbildung 33: Interindividueller Vergleich der Ergebnisse zu neutrophilen Granulozyten in der BAL aller Labore bzw. Untersucher zu den Pferden mit MEA.	107
Abbildung 34: Interindividueller Vergleich der Ergebnisse zu neutrophilen Granulozyten in der BAL aller Labore bzw. Untersucher zu den Pferden mit SEA.	108
Abbildung 35: Interindividueller Vergleich der Ergebnisse zu Makrophagen in der BAL aller Labore bzw. Untersucher zu den gesunden Pferden.	108
Abbildung 36: Interindividueller Vergleich der Ergebnisse zu Makrophagen in der BAL aller Labore bzw. Untersucher zu den Pferden mit MEA.	109
Abbildung 37: Interindividueller Vergleich der Ergebnisse zu Makrophagen in der BAL aller Labore bzw. Untersucher zu den Pferden mit SEA.	109
Abbildung 38: Interindividuelle Übereinstimmung der Ergebnisse aller 6 Labore für ausgewählte Parameter im TBS.	111
Abbildung 39: Interindividuelle Übereinstimmung der Ergebnisse aller 6 Labore für ausgewählte Parameter in der BAL.	111

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Referenzwerte der Differentialzellzählung des TBS gesunder Pferde aus Kontrollgruppen sowie vorgeschlagene physiologische Referenzwerte.	30
Tabelle 2: Referenzwerte der Differentialzellzählung der BAL gesunder Pferde aus Kontrollgruppen sowie vorgeschlagene physiologische Referenzwerte.	31
Tabelle 3: Klinisches Scoring System nach Barton und Gehlen 2022	56
Tabelle 4: Laborangebote zur zytologischen Untersuchung von TBS und BAL.....	58
Tabelle 5: Zytologischer Befundbogen TBS der Klinik für Pferde der Freien Universität Berlin.	62
Tabelle 6: Zytologischer Befundbogen BAL der Klinik für Pferde der Freien Universität Berlin.	63
Tabelle 7: Angaben der prozentualen Spannbreiten zur Definition der semiquantitativen Begrifflichkeiten beim TBS, %: Prozentangaben.....	68
Tabelle 8: Angaben der prozentualen Spannbreiten zur Definition der semiquantitativen Begrifflichkeiten bei der BAL, %: Prozentangaben.....	69
Tabelle 9: Aktuelle Angaben der Labore zur Differentialzellzählung im TBS.	70
Tabelle 10: Aktuelle Angaben der Labore zur Differentialzellzählung in der BAL.	70
Tabelle 11: Empfehlung einer einheitlichen Befundung zur Differentialzellzählung im TBS. .	71
Tabelle 12: Empfehlung einer einheitlichen Befundung zur Differentialzellzählung in der BAL.	71
Tabelle 13: Physiologische Zellverteilung für TBS und BAL.	72
Tabelle 14: Teil 1: Vereinheitlichtes Scoring System zur zytologischen Untersuchung von TBS und BAL.....	74
Tabelle 15: Teil 2: Vereinheitlichtes Scoring System zur zytologischen Untersuchung von TBS und BAL.....	75
Tabelle 16: Ergebnisse der Befunde aller Studienpferde beurteilt durch das Scoring System von Barton und Gehlen 2022.	83
Tabelle 17: Diagnosen für die lungengesunden Pferde.	120
Tabelle 18: Diagnosen für Pferde mit MEA.	121
Tabelle 19: Diagnosen für Pferde mit SEA.....	122

Abkürzungsverzeichnis

ACVIM	American college of Veterinary Internal Medicine
BAL	Bronchoalveoläre Lavage Flüssigkeit
BU	bakterielle Untersuchung
COB	chronisch obstruktive Bronchitis
COPD	chronic obstructive pulmonary disease (chronisch obstruktive Bronchitis)
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EA	equines Asthma
ECVCP	European college of Veterinary Clinical Pathology
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIPH	Exercise-Induced Pulmonary Hemorrhage (Leistungsinduziertes Lungenbluten)
G	Gauge (Durchmesser der Kanüle)
ggr.	geringgradig
hgr.	hochgradig
IAD	Inflammatory Airway Disease (entzündliche Atemwegserkrankung)
ICC	Intraklassenkorrelationskoeffizient
IL	Interleukin
INF- γ	Interferon- γ
Kap	Kapitel
kg	Kilogramm
LPS	Lipopolysaccharide
max.	maximal
MEA	mildes bis moderates equines Asthma
mgr.	mittelgradig
min.	Minute
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
NANC	nonadrenergic, noncholinergic
NET	Neutrophil Extracellular Traps (Neutrophile extrazelluläre Fallen)
OAW	obere Atemwege
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
RAO	Recurrent Airway Obstruction (wiederkehrende Atemwegserkrankung)
RT	Respirationstrakt
ROS	reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
SAD	Small Airway Disease (Erkrankung der kleinen Atemwege)
SAI	Small Airway Inflammation (Entzündung der kleinen Atemwege)
SEA	schweres equines Asthma

SPAOPD	Summer pasture associated obstructive pulmonary disease (Sommerweide-assoziierte obstruktive Lungenerkrankung)
spp.	Spezies (Mehrzahl)
Tab	Tabelle
TBS	Tracheobronchialsekret
T _H 1/2	T-Helfer Zellen 1/2
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
μm	Mikrometer
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1 Einleitung

EA ist eine häufig vorkommende chronische Erkrankung der Atemwege und kann Pferde jeden Alters betreffen. Der Erkrankung liegt eine multifaktorielle Ätiologie zugrunde, wobei die Exposition gegenüber organischem Staub, der besonders in Stallhaltungen anzutreffen ist, als Hauptursache für die Entstehung der Atemwegsentzündung angesehen wird. Die Erkrankung wird abhängig von den klinischen, endoskopischen und zytologischen Befunden in MEA und SEA eingeteilt. MEA geht unter anderem mit chronischem Husten einher und stellt eine wichtige Ursache für Leistungsinsuffizienz beim Pferd dar. Klinisch abzugrenzen von SEA ist es durch die fehlende Dyspnoe in Ruhe.

Neben einer speziellen klinischen Untersuchung des Atemtrakts, spielt die zytologische Untersuchung von TBS und BAL eine wichtige Rolle bei der Diagnosestellung von EA. Besonders die BAL hat sich als Mittel der Wahl zur Diagnosestellung von MEA etabliert. Bei der BAL handelt es sich um die Waschung eines Lungenareals. Allerdings sind bereits für die Durchführung der BAL verschiedene Protokolle in der Literatur beschrieben. Ebenso gibt es Unterschiede in den Protokollen zur Probenbearbeitung und zytologischen Auswertung von TBS und BAL. Dennoch gibt die Zytologie der beiden Arten der Probenentnahme wichtige Informationen über die Art und Dauer der Erkrankung und wird zum Teil sensitiver als die klinische Untersuchung angesehen. Bei der zytologischen Beurteilung von TBS- und BAL-Ausstrichen wird eine Differentialzellzählung der Entzündungszellen durchgeführt, wobei vor allem auf den Anteil von neutrophilen Granulozyten, eosinophilen Granulozyten und Mastzellen geachtet wird. Dabei gibt es bei der BAL allgemein anerkannte Referenzwerte dieser Zellarten, ab denen MEA und SEA diagnostiziert werden. Diese beruhen auf einer genauen Auszählung von 400-500 Zellen pro Objektträger-Ausstrich und einer prozentualen Angabe zum Anteil dieser Zellarten am Gesamtzellbild.

Bei einer Untersuchung des Atemtraktes werden meist TBS- und/oder BAL-Proben gewonnen und zur zytologischen Beurteilung an ein Labor geschickt. Daraufhin wird von dem zuständigen Labor eine zytologische Verdachtsdiagnose erstellt, die z.T. in erheblichem Maße zur endgültigen Diagnosestellung durch den Tierarzt herangezogen wird.

Ziel dieser Arbeit ist der Vergleich zytologischer Ergebnisse und Verdachtsdiagnosen zwischen und innerhalb verschiedener, größerer und häufig von Praktikern genutzten Labore, um die Zuverlässigkeit der zytologischen Untersuchung von TBS und BAL als diagnostisches Mittel zur Diagnosestellung von EA zu überprüfen.

Die erste Hypothese dieser Arbeit ist demnach, dass die Ergebnisse der TBS- und BAL-Zytologie als zuverlässige Kriterien zur Atemwegsdiagnostik herangezogen werden können und einen wichtigen Anteil an der Diagnosestellung von EA haben.

Als zweite Hypothese besteht die Annahme, dass bei einem intra- und interindividuellen Vergleich zytologischer Ergebnisse von TBS und BAL innerhalb und zwischen mehreren Laboren nur eine geringe oder gar keine Varianz der Ergebnisse und Verdachtsdiagnosen besteht.

2 Literaturübersicht

2.1 Terminologie

Der Begriff equines Asthma wurde eingeführt um eine chronische Erkrankung der unteren Atemwege des Pferdes zu beschreiben (Couetil et al. 2016). Das ACVIM Consensus Statement zur IAD schlug vor die Begriffe IAD, SAD und SAI durch den Begriff MEA zu ersetzen (Bullone und Lavoie 2015; Couetil et al. 2016). Die IAD ist eine milde, nicht-septische Atemwegserkrankung insbesondere junger Leistungspferde (Bullone und Lavoie 2015; Couetil et al. 2016).

Der Begriff RAO, der 2001 den Begriff der COB und im Englischen COPD oder „Heaves“ ersetzt hat, wird nun zusammen mit der SPAOPD als SEA bezeichnet (Bond et al. 2018; Lavoie 2017; Robinson 2001). Die RAO wurde als Atemwegsobstruktion des erwachsenen Pferdes benannt, die durch Umgebungswechsel oder die Gabe von Bronchodilatoren reversibel ist (Robinson, 2001).

2.2 Prävalenz

Das Vorkommen von MEA wurde in Populationen einer großen Feldstudie und einer Studie zu Rennpferden im Training mit 66 bis 80% angegeben (Ivester et al. 2018; Wasko et al. 2011). Die Diagnosen wurden mit Hilfe der Zytologie der BAL gestellt, wobei >5% neutrophile Granulozyten, >2% Mastzellen, >1% eosinophile Granulozyten in der Differentialzellzählung ausschlaggebend für MEA waren (Ivester et al. 2018; Wasko et al. 2011). Die Grenzwerte dieser Zellarten wurden allerdings im Consensus Statement zur IAD von 2016 erhöht (Couetil et al. 2016), was in diesen Studien zu einer anderen Prävalenz führen würde. Die klinischen Symptome der Pferde wurden in einer Studie zusätzlich dokumentiert (Wasko et al. 2011). Bei einer weiteren Studienpopulation wurden bei allen für gesund eingestufte Sportpferden Hinweise auf mildes equines Asthma gefunden, wobei auch hier Erhöhungen der Entzündungszellen in der BAL bereits ab >5% neutrophile Granulozyten vermerkt wurden (Gerber et al. 2003). Es wurde überlegt, ob eine weitere Einteilung in mildes equines Asthma erfolgen soll, um subklinisch erkrankte Pferde zu erfassen (Couetil et al. 2020b; Lavoie 2017). SEA kommt dagegen seltener vor und wird mit einer Prävalenz von 14-17% bei adulten Pferden angegeben (Hotchkiss et al. 2007; Pirie 2014; Wasko et al. 2011). Das Risiko für SEA steigt signifikant mit dem Alter wobei >7 Jahre alte Pferde eine 6-7mal höhere Wahrscheinlichkeit haben an SEA zu erkranken als <4-jährige (Couetil und Ward 2003). MEA ist eher bei jüngeren Pferden anzutreffen (Couetil et al. 2016). Es wurde festgestellt, dass

Pferde mit dem neutrophilen Subtyp des MEA signifikant älter waren als bei anderen Subtypen des MEA, die durch Erhöhungen der Anteile an Mastzellen und eosinophilen Granulozyten in der BAL gekennzeichnet sind (s. Kap. 2.3.) (Lavoie et al. 2011). Die Untersuchung zur Prävalenz von EA bei einer Herde in Weidehaltung ohne respiratorische Symptome ergab ebenfalls eine hohe Prävalenz von MEA (60% im Sommer, 87% im Winter) und eine geringere Prävalenz von SEA (10% im Sommer, 4,3% im Winter) (Davis und Sheats 2019). Auch hier konnte der neutrophile Subtyp des MEA häufiger bei den adulten Pferden festgestellt werden (Davis und Sheats 2019). Allerdings ist anzumerken, dass die Diagnose hier ebenfalls nur über die zytologischen Befunde der BAL erfolgt ist und eine kleine Studienpopulation zur Verfügung stand (Davis und Sheats 2019).

2.3 Ätiologie

Eine multifaktorielle Genese wird bei der Entstehung von EA angenommen (Couetil et al. 2020b). Nicht infektiöse Ursachen wie die Exposition der Pferde gegenüber organischem und anorganischem Staub, wie er in Stallungen vorkommt, scheint neben weiteren Ätiologien wie unter anderem der Genetik eine Hauptursache bei der Entstehung der Entzündungsreaktion zu sein (Gerber et al. 2009; Ivester et al. 2014b; Couetil et al. 2020b). Die Entzündungsreaktion wurde als eine Dysregulation der Homöostase von Entzündungszellen in den Atemwegen definiert, die zu klinischen Symptomen unterschiedlicher Schwere führen (Couetil et al. 2016). Unterschiedliche Subtypen werden bei MEA durch Erhöhungen verschiedener Entzündungszelltypen in der BAL bestimmt (Bedenice et al. 2008; Hare und Viel 1998; Pirie et al. 2016; Richard et al. 2009). Die Subtypen unterscheiden sich durch eine milde Erhöhung des Anteils der neutrophilen Granulozyten (>10%) oder einer Erhöhung des Anteils der Mastzellen (>5%) und/oder eosinophilen Granulozyten (>5%), ebenso kann es zu gemischten Entzündungszelltypen kommen (Bedenice et al. 2008; Hare und Viel 1998; Pirie et al. 2016; Richard et al. 2009). SEA geht mit einer deutlichen Erhöhung des Anteils der neutrophilen Granulozyten in der BAL einher (>25%) (Couetil et al. 2016).

Bei MEA konnte eine Assoziation zwischen der Aufstallung und Heufütterung und der Erhöhung von Entzündungszellen festgestellt werden (Holcombe et al. 2001; Ivester et al. 2014a; Olave et al. 2021). In konventionellen Stallhaltungen kommt es zu erhöhten Werten an organischem Staub, β -Glucangehalt sowie einem 10-fach höherem Endotoxingehalt in der Atmungszone der Pferde als in Weidehaltung (McGorum et al. 1998; Samadi et al. 2009). Organischer Staub ist definiert als Ansammlung von Partikeln, denen pathogene und nicht-pathogene Bakterien, Pilze, bakterielle Endotoxine (Zellwandkomponente von gram-negativen Bakterien mit starker proinflammatorischer Wirkung), Mykotoxine, β -Glucan (Pilze, Bakterien, Pflanzen) und Pollen anhaften (Douwes et al. 2003).

Bei jungen Rennpferden konnte ein Zusammenhang zwischen der Staubexposition und der Erhöhung neutrophiler Granulozyten sowie zwischen β -Glucan und erhöhten Werten an Mastzellen hergestellt werden (Ivester et al. 2018). Eine Mastzellentzündung konnte hier bei über der Hälfte der jungen Pferde festgestellt werden, wobei bereits eine Erhöhung der Mastzellen von >2% ausschlaggebend war (Ivester et al. 2018). Heulagefütterung führte im Gegensatz zur Heufütterung zu einer geringeren Exposition gegenüber lungengängigem Staub und Endotoxin und keiner Veränderung der neutrophilen Granulozyten, wie eine Studie belegt (Olave et al. 2021). Fütterung von Heu aus dem Heunetz resultierte in einer signifikant höheren Exposition gegenüber lungengängigen und inhalierbaren Partikeln und lungengängigem Endotoxin (Ivester et al. 2014b). Hier war eine eosinophile Entzündung mit der erhöhten Exposition verknüpft, was Hinweise auf die Beteiligung von Umweltantigenen bei MEA gibt (Ivester et al. 2014b). Lungengängige Partikel (Feinstaub) sind definiert als Partikel mit einem aerodynamischen Durchmesser von $4\mu\text{m}$, bei dem die Wahrscheinlichkeit die bronchio-alveolar Region zu erreichen bei 50% liegt (Ivester et al. 2014b).

Durch Veränderungen in der Haltung und Fütterung kann die Staubkonzentration signifikant vermindert werden, wobei die Fütterung einen größeren Einfluss auf die Staubkonzentration hat (Clements und Pirie 2007).

Auch infektiöse Ätiologien wurden in Zusammenhang mit MEA gebracht, wobei bakterielle Agenzien (u.a. *Streptococcus equi subspecies zooepidemicus*, *Actinobacillus spp.*, *Pasteurella spp.*) als Risikofaktoren für die Akkumulation von Trachealmukus angesehen werden (Cardwell et al. 2014). Allerdings ist nicht klar, ob sie an der Entstehung von EA beteiligt sind oder sekundär die Atemwege besiedeln. Studien zur Beteiligung einer viralen Ätiologie ergeben unterschiedliche Ergebnisse (Couetil et al. 2020b).

Bei SEA scheint ebenfalls die Exposition gegenüber Heu und Stroh, insbesondere zu inhalierten Schimmelpilzen aus schlechter Heuqualität, eine Hauptrolle in der Ätiologie zu spielen (Couetil et al. 2020b; Pirie 2014). Die Inhalation einer Heustaub suspension sorgte für die charakteristische neutrophile Entzündungsreaktion sowie zu Veränderungen der Lungenfunktion und einer Hypersekretion von Mukus (Pirie et al. 2002). Endotoxin hat einen signifikanten Einfluss auf die Induktion der Entzündung, allerdings ist die Wirkung bei Inhalation weiterer Komponenten von organischem Staub verstärkt (Pirie et al. 2003a). Eine Inhalation von Lipopolysacchariden (LPS) (*Salmonella Thyphimurium*) induzierte eine dosisabhängige Atemwegsentzündung bei gesunden und erkrankten Pferden, führte allerdings im Vergleich zur Heu/Stroh Belastung zu keiner Erhöhung des Trachealmukus (Pirie et al. 2001). Daher wird angenommen, dass Endotoxine (LPS) an der Ätiologie von SEA beteiligt sind, allerdings auch weitere proinflammatorische Agentien im organischen Staub eine Rolle spielen (Pirie et al. 2001). Bei gesunden Pferden kann es bei schlechter Lufthygiene

in Stallhaltung durch erhöhte Konzentrationen an Endotoxin zu Atemwegsentzündungen kommen (Pirie et al. 2001).

Inhalationprovokationen mit Extrakten von *Aspergillus fumigatus* und *Micropolyspora faeni* führten zu einer pulmonalen Entzündungsreaktion bei Pferden mit SEA (Mcgorum et al. 1993b). Ebenso zeigten weitere Untersuchungen eine Assoziation zwischen der Inhalation von Schimmelsporen und der pulmonalen Entzündungsreaktion (Pirie et al. 2003b). Die Exposition gegenüber schimmeligem Heu sorgte bei Pferden mit SEA im Vergleich zu gesunden Pferden zu Veränderungen der Lungenfunktion (Tesarowski et al. 1996).

Eine hohe Umwelttemperatur, Feuchtigkeit sowie eine erhöhte Pollenkonzentration an heißen Tagen stehen in Zusammenhang mit einer Verstärkung der klinischen Symptome von SEA (Bullone et al. 2016).

2.4 Immunologische Situation und die Rolle der neutrophilen Granulozyten bei der Entzündungsreaktion

Die Exposition gegenüber inhalierten Schimmelsporen und organischen Staubpartikeln aus Heu und Stroh löst die angeborene und adaptierte Immunantwort aus (Pirie 2014). Nach Antigenexposition (Stroh und Heu) kommt es bereits nach 4-5 Stunden zu einer Erhöhung der neutrophilen Granulozyten im Atemtrakt von Pferden mit EA, gefolgt von klinischen Symptomen und einer Atemwegsobstruktion (Fairbairn et al. 1993).

Lymphozyten stellen eine wichtige Gruppe von Immunzellen der adaptiven Immunantwort dar, wobei die T_H1 und T_H2 Zellen über die Freisetzung von Zytokinen Entzündungsreaktionen verursachen (Lavoie et al. 2011). Die Zytokine sind dabei Mediatoren, die an der Regulation der Immunantwort sowie der Initiation, Aufrechterhaltung und Resolution der Entzündung beteiligt sind (Lavoie et al. 2011).

Bei Pferden mit SEA, welche klinische Symptome aufwiesen und 3 Wochen in staubiger Umgebung gehalten wurden, kam es zu einer erhöhten Expression von IL-4 und IL-5 und einer verminderten Expression von INF- γ , was auf die Beteiligung des T_H2 Zytokin Profils schließen lässt (Cordeau et al. 2004; Lavoie et al. 2001). Dies weist auf eine allergische Kondition bei SEA hin (Lavoie et al. 2011). Befunde einer weiteren Studie ergaben erhöhte Werte von INF- γ (T_H1 Antwort) bei Pferden mit SEA nach Aufstallung. Es konnte keine Erhöhung von IL-4 bei diesen Pferden festgestellt werden, wodurch die Autoren eine alleinige T_H2 Antwort widerlegten (Ainsworth et al. 2003). Die Exposition gegenüber schimmeligem Heu führte ebenfalls zu einer erhöhten Expression von IL-17 mRNA bei Pferden mit SEA, welches vermutlich an der Aktivierung und Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Atemwege beteiligt ist (Debrue et al. 2005; Murcia et al. 2016). Ebenso sorgt IL-17 für eine verminderte Apoptose der neutrophilen Granulozyten (Debrue et al. 2005; Murcia et al. 2016).

Trotz der Unstimmigkeiten über das genaue Zytokinprofil und somit den immunologischen Prozess ist die Konsequenz der T-Zell Aktivierung die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Atemwege (Pirie 2014). Es wird vermutet, dass Unterschiede in den Zytokinprofilen durch unterschiedliche Zeitpunkte der Probenentnahme in Bezug auf die Antigenbelastung und dem Auftreten klinischer Symptome bedingt sein können (Pirie 2014). Bei MEA wurden erhöhte Mastzellzahlen mit erhöhten Konzentrationen an IL-4 und INF- γ in Zusammenhang gebracht (Zytokine der T_H1 und T_H2 Antwort) (Lavoie et al. 2011). In einer weiteren Studie konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Konzentration an IL-4, welches von T_H2 Zellen produziert wird, in der Gruppe mit erhöhter Mastzellzahl hochreguliert ist (Beekman et al. 2012). Darüber hinaus konnte in der Gruppe mit MEA eine erhöhte Expression weiterer T_H2 Zytokine (IL-5,6 und 10) festgestellt werden, allerdings keine erhöhte Expression von INF- γ (Beekman et al. 2012). Da IL-4 allerdings auch von Mastzellen sezerniert wird und in einer Studie nicht festgestellt werden konnte, welche Zellpopulation für die erhöhte Expression von IL-4 verantwortlich war, kann entweder eine T_H2 Antwort vorliegen oder aber lediglich eine erhöhte Mastzellpopulation wiedergespiegelt werden (Lavoie et al. 2011). Eine weitere Studie vermutet die Assoziation des neutrophilen Subtyps mit der angeborenen Immunantwort und einer T_H1 Antwort aufgrund einer Erhöhung von Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und INF- γ im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren (Richard et al. 2014). Der neutrophile Subtyp wurde ebenfalls mit einer Erhöhung an IL-1 β , IL-17 und IL-8 in Zusammenhang gebracht (Beekman et al. 2012; Lavoie et al. 2011). IL-1 β und TNF- α werden vor allem von Makrophagen sezerniert und modulieren die Entzündungs- und Immunantwort (Lavoie et al. 2011).

Auch bei MEA ist der genaue immunologische Prozess nicht abschließend geklärt, allerdings lassen die Ergebnisse eine Beteiligung des angeborenen und adaptiven Immunsystems vermuten sowie Unterschiede der Pathophysiologie zwischen den verschiedenen Subtypen erahnen (Couetil et al. 2016).

IL-4 wirkt bei der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten bei einer allergischen Entzündungsreaktion mit und die Aktivierung führt zur Freisetzung weiterer proinflammatorischer Zytokine wie IL-8 und TNF- α , welche zur Aufrechterhaltung der Entzündung beitragen (Lavoie-Lamoureux et al. 2010). Des Weiteren kommt es bei erhöhter Staubexposition durch die Stimulierung von Makrophagen zu einer erhöhten chemotaktischen Aktivität (Baggiolini und Clark-Lewis 1992; Beekman et al. 2012; Franchini et al. 1998). Makrophagen produzieren mRNA für IL-8 und Makrophagen Inflammatory-Protein-2 (MIP-2), die eine potente und spezifische chemotaktische Aktivität für neutrophile Granulozyten aufweisen (Baggiolini und Clark-Lewis 1992; Beekman et al. 2012; Franchini et al. 1998). Durch die Toxizität der sezernierten Produkte neutrophiler Granulozyten, welche in hohem Maß bei SEA vorkommen können, wird das Gewebe geschädigt und dies führt zu einer chronischen Entzündung mit Hypersekretion und Hyperaktivität (Franchini et al. 1998).

Neutrophile Granulozyten sind wichtige Zellen der angeborenen Immunantwort unter anderem durch die Phagozytose von Erregern und die Freisetzung von ROS und NETs (Davis und Sheats 2021; Uberti und Moran 2018). ROS sind eine wichtige Komponente des angeborenen Immunsystems, können allerdings auch die Wirtszellen schädigen (Davis und Sheats 2021). Es wurde unter anderem gezeigt, dass ROS zu einer vermehrten Apoptose von Epithelzellen beitragen (Bucchieri et al. 2002). NETs bestehen aus DNA in Verbindung mit Histonen, den am häufigsten vorkommenden Proteinen in NETs, sowie granulären Proteinen wie Elastase und Myeloperoxidase und mehreren zytoplasmatischen Proteinen (Saffarzadeh et al. 2012). Sie haben eine zytotoxische Wirkung auf respiratorische Epithelien und Endothelzellen (Saffarzadeh et al. 2012). NETs konnten in der BAL von Pferden mit SEA, nicht aber bei equinem Asthma in Remission oder bei gesunden Pferden festgestellt werden (Cote et al. 2014).

Zu einer Entwicklung eines chronischen Entzündungsprozesses kann es außerdem durch eine Imbalance zwischen Apoptose und Nekrose zugunsten der Nekrose neutrophiler Granulozyten kommen (Haslett 1997). Bei der Nekrose bleibt im Vergleich zur Apoptose die Zellmembran nicht intakt und toxische Zellinhalte (zytosolische Enzyme und proinflammatorische Substanzen) werden freigesetzt (Haslett 1997). Dies kann zu einem persistierenden Gewebeschaden und einer Verstärkung der Entzündung beitragen (Haslett 1997). Ebenso trägt eine verzögerte Apoptose zum Entzündungsgeschehen bei EA bei, da normalerweise apoptotische Neutrophile durch Sekretion von Mediatoren eine weitere Rekrutierung neutrophiler Granulozyten inhibieren und ihre eigene Phagozytose durch Makrophagen initiieren (Ortega-Gomez et al. 2013).

2.5 Pathogenese

Zur Eliminierung schädigender, inhalierter Noxen stehen der Lunge Verteidigungsmechanismen zur Verfügung (Derksen und Robinson 2002). Die mukoziliäre Clearance, Husten, Phagozytose von inhaliertem Material sowie eine Kontraktion der glatten Muskulatur, um den Eintritt von Noxen zu verhindern, werden zum Schutz genutzt (Derksen und Robinson 2002). Bei EA kommt es durch verschiedene Mechanismen zur Atemwegsobstruktion und somit zu einem erhöhten respiratorischen Aufwand (Bullone 2016; Robinson et al. 2003). Eine erhöhte Mukusproduktion, *Remodeling* (Umbauvorgänge) der Atemwege, Bronchospasmus und Hyperreaktivität der Atemwege tragen zum obstruktiven Charakter bei (Bullone und Lavoie 2015; Robinson 2001).

Zwei wichtige Parameter in der Lungenmechanik stellen die *Resistance* und die *Compliance* dar (Bullone 2016). Die *Resistance* ist der Atemwegswiderstand und wird primär durch den Atemwegsdurchmesser bestimmt (Bullone 2016). Dieser kann durch die Kontraktion der

glatten Muskulatur (Bronchospasmus), eine Atemwandverdickung (Ödem/*Remodeling*) und die Verlegung des Lumens (Mucus, Zellakkumulation) beeinflusst werden (Bullone 2016). Die *Compliance* ist ein Maß für die Dehnbarkeit der Lunge, wobei die Volumenänderung der Lunge durch eine verbundene Druckänderung entsteht (Bullone 2016). Durch Veränderung der Elastizität der Lunge (z.B. fibröses Gewebe) kann es zu Veränderungen in der Lungenmechanik kommen (Bullone 2016). Die Atemwegsobstruktion wird durch eine Erhöhung der *Resistance*, Verminderung der *Compliance* und einen erhöhten Intrapleuraldruck bestimmt (Jackson et al. 2000; Robinson et al. 1999). Durch Veränderungen in der Haltung und Fütterung kann es bereits nach 3 Tagen zur Verbesserung der Parameter kommen (Jackson et al. 2000).

Bei Pferden mit SEA kommt es zum Verlust der zilienträgenden Zellen im Respirationstrakt sowie zum Ersatz durch undifferenzierte Zellen (Kaup et al. 1990b). Becherzellen kommen beim gesunden Pferd nicht in den terminalen Bronchiolen vor (Kaup et al. 1990a). Bei EA kommt es allerdings zur Becherzellhyperplasie, welche in schweren Fällen die in den Bronchiolen vorkommenden Clarazellen ersetzen (Kaup et al. 1990a; Kaup et al. 1990c). Bei Irritation und Entzündung stimulieren Entzündungsmediatoren wie die neutrophile Elastase die Mucusproduktion (Derkson und Robinson 2002). Zusätzlich verändert sich die Viskosität des Mucus durch Strukturveränderungen von Oligosaccharidseitenketten am Mucinmolekül (Jefcoat et al. 2001). Diese Befunde erklären die Störung der mukoziliären Clearance durch den Verlust der Zilien, die den Mucus aus dem Atemtrakt entfernen sollen und die intraluminale Akkumulation von Mucus in den Atemwegen (Hyper- und Dyskrinie) (Bullone et al. 2018; Kaup et al. 1990b). Strukturelle Veränderungen der Atemwegswand in den kleinen Atemwegen stellen erhöhte Kollagengehalte in der *Lamina propria*, eine peribronchioläre Metaplasie, interstitielle Fibrose und eine Erhöhung der glatten Muskelzellmasse dar (Bullone et al. 2018; Herzberg et al. 2006; Setlakwe et al. 2014). Die Prävalenz dieser Befunde ist bei Pferden in Remission geringer, was auf wenigstens teilweise reversible Veränderungen schließen lässt (Bullone et al. 2018). Antigenexposition führte bei chronisch erkrankten Pferden nur zu geringer Veränderung der bereits etablierten Hyperplasie der glatten Muskulatur (Leclere et al. 2011). In den peripheren Atemwegen erkrankter Pferde wurde doppelt so viel glatte Muskulatur festgestellt als bei gesunden Pferden (Leclere et al. 2011). Es wird vermutet, dass die Veränderungen in der extrazellulären Matrix zur Atemwegsobstruktion beitragen (Setlakwe et al. 2014). Ebenso konnten Entzündungszellinfiltrate in der Atemwegswand und peribronchial festgestellt werden (Herzberg et al. 2006; Kaup et al. 1990c). In der Alveolarregion kommt es zur Dilatation der Wand durch Ödematisierung und zu fokaler fibrosierender Alveolitis. Ebenso zeigen Typ I und II Alveolarzellen degenerative Veränderungen (Kaup et al. 1990c). Bei einer Untersuchung zur Korrelation der Schwere

pulmonaler Läsionen und der BAL Neutrophilie wurde herausgefunden, dass die Schwere der bronchialen Entzündung bei Pferden in Exazerbation höher ist als in Remission, aber <20% neutrophilen Granulozyten mit schwereren Läsionen einhergehen anstatt >20% (Bullone et al. 2018). Es wurde vermutet, dass Mukusplugs bei schweren pulmonalen Läsionen eine Lavage der distalen Atemwege verhindern und daher die Anzahl der neutrophilen Granulozyten vermindert ist (Bullone et al. 2018). Daher können auch bei geringeren Prozentzahlen an neutrophilen Granulozyten bereits schwere pulmonale Läsionen vorliegen.

Auch bei MEA kommt es bereits zum *Remodeling* in Form einer Hyperplasie des Epithels, einer Verdickung der *Lamina Propria* und einer Fibrose der glatten Muskulatur ebenso wie zu submukösen Entzündungszellinfiltraten (Bessonnat et al. 2022). Die Korrelation zwischen einer Verdickung der *Lamina Propria* und der *Resistance* lässt auch bei MEA eine Beteiligung an der Atemwegsobstruktion vermuten (Bessonnat et al. 2022; Setlakwe et al. 2014). Darüber hinaus konnten Veränderungen in der Kontraktilität der glatten Muskulatur und ein Zusammenhang mit einer neutrophilen Entzündung in den Atemwegen festgestellt werden (Dupuis-Dowd und Lavoie 2022).

Neben der Mukusakkumulation und der Atemwandverdickung führt der Bronchospasmus durch die Kontraktion der glatten Muskulatur zur Atemwegsobstruktion (Derksen und Robinson 2002). Durch inhalierte Reizstoffe und Entzündungsmediatoren kommt es zur Stimulation von Rezeptoren in der Mukosa, wodurch das parasympathische Nervensystem (N. vagus) aktiviert wird und zu einem Bronchospasmus führt (Derksen und Robinson 2002). Bei Pferden mit SEA ist der Bronchospasmus eher durch Mastzellmediatoren als durch neutrophile Granulozyten beeinflusst, welche die Kontraktion der glatten Muskulatur erleichtern (Jackson et al. 2000; Olszewski et al. 1999).

Die Hyperreaktivität der Atemwege führt zur Verengung der Luftwege als Antwort auf verschiedene Stimuli, da die Atemwege sensitiver gegenüber exzitatorischen Neurotransmittern, Entzündungsmediatoren und unspezifischen Reizstoffen wie Staub reagieren (Derksen und Robinson 2002). Die Hyperreaktivität kann Folge einer erhöhten Aktivierung der glatten Muskulatur sein, die entweder auf eine erhöhte Expression bronchokonstriktorischer Agentien durch Entzündungszellen, eine vagale Dysregulation oder Atemwegsgefäßanomalien zurückzuführen sein kann (Bosse et al. 2013). Die verminderte Funktion von *NANC*-Nerven (nonadrenergic, noncholinergic), die normalerweise eine Relaxation der glatten Muskulatur bewirken, kann ebenfalls zur Überempfindlichkeit und Obstruktion der Atemwege beitragen (Yu et al. 1994).

2.6 Klinische Symptome

Bei EA kommt es zu einer Verengung der Atemwege, wodurch die Atmung erschwert, der Gasaustausch beeinflusst und folglich die Leistung vermindert ist (Bullone und Lavoie 2015; Derksen und Robinson 2002; Hoffman et al. 2003). MEA kann bei Pferden jeden Alters auftreten, allerdings kommt es vermehrt bei jüngeren Rennpferden vor (Couetil et al. 2007). Die Leistungsinsuffizienz und eine verlängerte Erholungszeit nach der Belastung sind vor allem bei mildem equinem Asthma anzutreffen (Lavoie 2021). Chronischer, intermittierender Husten (>3 Wochen) und eventuell Tachypnoe in Ruhe ohne erhöhten Atemaufwand sind typische Symptome für die moderate Form des Asthmas (Couetil et al. 2016). Husten kann während der Belastung oder in Ruhe auftreten, wobei das Fehlen des Hustens die Erkrankung nicht ausschließen lässt (Couetil et al. 2007). Klinische sowie hämatologische Anzeichen einer systemischen Infektion müssen ausgeschlossen werden (Couetil et al. 2007). Die Auskultation der Lunge weist normalerweise keine Auffälligkeiten auf, wobei manche Pferde verstärkte Atemgeräusche zeigen können (Couetil et al. 2007). Die Unterscheidung zu SEA erfolgt durch das Fehlen einer erschwerten Atmung in Ruhe, allerdings kann die Unterscheidung zu SEA in Remission durch klinische Symptome allein schwierig sein (Couetil et al. 2007).

Bei SEA weisen klinische Symptome in Ruhe auf ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium hin, da eine große Anzahl der peripheren kleinen Bronchien verengt sein muss, bis der Luftstrom so weit behindert wird, dass klinische Symptome auftreten (Leguillette 2003). Zu den Symptomen von SEA zählen Husten, Nasenausfluss, erhöhter Atemaufwand in Ruhe in Verbindung mit Tachypnoe (Couetil und Thompson 2020b; Davis et al. 2002). Die Atmung teilt sich in eine schnelle Inspiration und eine verstärkte und verlängerte Expiration (Leguillette 2003). In chronischen und schweren Fällen kann es zu Gewichtsverlust und zur Ausbildung einer „Dampfrinne“ durch die Hypertrophie des äußeren, schrägen Bauchmuskels kommen (Couetil und Thompson 2020b; Davis et al. 2002; Leguillette 2003; Robinson 2001). In Scores zur Einteilung der klinischen Befunde werden darüber hinaus das Nüsterblähen und die Afteratmung mit aufgenommen (Barton und Gehlen 2022; Ohnesorge et al. 1998). Bei der Auskultation können ein vergrößertes Lungenfeld und verstärkte bronchovesikuläre Geräusche auffallen, Pfeifen und Giemen kommen in schweren Fällen vor (Barton und Gehlen 2022; Leguillette 2003). Bei einer starken Mukusakkumulation kommt es zu auskultatorisch feststellbaren trachealen Keuchgeräuschen (Leguillette 2003).

Die Entnahme von arteriellem Blut sowie eine Bronchoskopie zur Visualisierung der Atemwege mit Entnahme von TBS und/oder der Durchführung einer BAL schließen sich der klinischen Untersuchung an. Die Befunde der zytologischen Untersuchung von TBS und BAL werden unterstützend zur Diagnosestellung herangezogen (Couetil et al. 2016).

2.7 Diagnostik

2.7.1 Bronchoskopie und Probenentnahme

2.7.1.1 Indikationen für die Entnahme von TBS und BAL

Um zu entscheiden welche Probenart für den Patienten besser geeignet ist, sollte man den Vorbericht und die klinischen Symptome berücksichtigen (Mazan 2018). Wenn es möglich ist, sollten bereits eine begründete Idee einer Verdachtsdiagnose sowie Kenntnisse über dessen Pathophysiologie vorliegen (Mazan 2018). Die Aspiration von TBS ist vor allem bei einem infektiösen lokalisierten Prozess innerhalb der unteren Atemwege wie einer Bronchopneumonie, Pleuropneumonie oder einem Lungenabszess geeignet (Couetil und Thompson 2020a). Die Durchführung einer BAL ist bei diffusen Lungenerkrankung wie equinem Asthma, EIPH oder bestimmten infektiösen Lungenerkrankungen wie der equinen multinodulären Lungenfibrose indiziert (Couetil Thompson 2020a; Rush und Mair 2004). Bei der BAL wird lediglich ein kleiner peripherer Lungenabschnitt beprobt, wohingegen das TBS eine Poolprobe der gesamten Lunge darstellt (May und Gehlen 2009). Das TBS besteht aus einer Kombination aus rückwärts-fließendem Sekret, aus den Sekreten der unteren Atemwege und dem eigentlichen Trachealsekret (Mazan 2018).

Beim Vorliegen eines SEA in Exazerbation mit klinischen Symptomen wie Tachypnoe und Dyspnoe in Ruhe sollte keine BAL durchgeführt werden (Hoffman 2008). Weitere Kontraindikationen stellen eine Zyanose, Hypotension, Arrhythmien oder paroxymaler Husten dar (Hoffman 2008). Des Weiteren kann bei bakteriellen Lungenerkrankungen eine BAL zur Verteilung der Keime in weitere Lungenabschnitte führen (May und Gehlen 2009).

Vorteile der BAL sind eine gute Korrelation mit den pathohistologischen Befunden des Lungengewebes sowie eine bessere Morphologie und Identifikation der Zellen als im TBS (McGorum und Dixon 1994; Rush und Mair 2004). Dagegen ist die Entnahme von TBS mit weniger Aufwand verbunden, benötigt nicht immer eine Sedation des Pferdes und ist bei guter Probenentnahme frei von nasopharyngealer bakterieller Kontamination und daher gut geeignet für eine mikrobiologische Untersuchung (McGorum und Dixon 1994). Beide Proben sollten entnommen werden, wenn keine Verdachtsdiagnose zu stellen ist, um die diagnostische Aussagekraft zu erhöhen (Couetil und Thompson 2020a). Dabei sollte zunächst die Entnahme des TBS erfolgen, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden (Couetil und Thompson 2020a). Die Zytologie des TBS korreliert darüber hinaus nicht immer mit der der BAL (McGorum und Dixon 1994; Schwarz und Kühn 2021).

2.7.1.2 Entnahme von Tracheobronchialsekret

In der Literatur sind verschiedene Möglichkeiten zur Entnahme von TBS beschrieben. Zum einen ist eine transkutane Katheterisierung in der Mitte der Trachea möglich, zum anderen kann eine Aspiration von TBS über den Arbeitskanal eines Videoendoskops im Rahmen einer

Bronchoskopie der Atemwege durchgeführt werden (Couetil und Thomson 2020a, May und Gehlen 2009, Barton et al. 2007, Hewson und Viel 2002, Mazan 2018).

Bei der Probennahme des TBS über einen Katheter im Arbeitskanal des Endoskops ist die Visualisierung der Atemwege inklusive der Beurteilung der Quantität und Qualität des Trachealsekrets möglich (Hoffman und Viel 1997). Darüber hinaus wird ein mögliches Ödem der Atemwege anhand der Bifurcatio tracheae beurteilt, wobei in einer Studie kein Zusammenhang zwischen der Septumdicke und den klinischen, endoskopischen oder zytologischen Eigenschaften von gesunden und erkrankten Pferden festgestellt werden konnte (Koch et al. 2007). Dagegen wiesen Pferde ≥ 10 Jahre einen höheren Septumscore auf (Koch et al. 2007).

Der TBS-Katheter kann vor der Probenentnahme mit sterilem Gel umhüllt werden, das vor der Probennahme wieder hinausgepustet wird (Hewson und Viel 2002; Whitwell und Greet 1984). Dies soll eine möglichst sterile Probenentnahme ermöglichen (Hewson und Viel 2002; Whitwell und Greet 1984). Beim Vorhandensein von viel Sekret kann dieses über einen Katheter am tiefsten Punkt oder im septumnahen Abschnitt aspiriert werden (May und Gehlen 2009). Sollte kein Sekret vorhanden sein, kann eine Trachealspülung mit 20-30 ml steriler isotoner Natriumchloridlösung durchgeführt werden (Couetil und Thompson 2020a). Die Instillation und Aspiration der Flüssigkeit sollte zügig erfolgen, da andernfalls die Flüssigkeit in den peripheren Anteilen der Lunge verloren geht (Mazan 2018).

Eine alternative Entnahmemöglichkeit stellt die invasive transkutane Katheterisierung dar. Hierbei werden Proben ohne oropharyngeale Kontamination gewonnen (Barton et al 2007). Diese erfolgt im ventralen Bereich der Trachea im mittleren bis distalen Drittel des Halses (Barton et al. 2007; Couetil und Thompson 2020a; Hoffman und Viel 1997). Zur Vorbereitung wird die ausgewählte Stelle geschoren, steril vorbereitet sowie eine subkutane Lokalanästhesie gesetzt (Barton et al 2007; Couetil und Thompson 2020a; Hoffman und Viel 1997). Zunächst wird eine Stichinzision durch die Haut durchgeführt und anschließend eine Nadel zwischen zwei Trachealringen in die Trachea in Richtung Bifurcatio tracheae vorgeschoben. Ein Katheter wird durch die Nadel 30-40 cm in kaudale Richtung vorgeschoben, 20-30 ml einer sterilen Kochsalzlösung eingegeben und direkt wieder aspiriert (Couetil und Thompson 2020a; Hoffman und Viel 1997). Die gewonnene Probe sollte für die Zytologie in ein EDTA-Röhrchen überführt werden (Couetil und Thompson 2020a; Hoffman und Viel 1997). Die Proben sollten zügig bearbeitet werden, da eine Verzögerung zu einer bakteriellen Überwucherung und zur Zelldegeneration führt (s. Kap. 2.7.2.1.) (Hoffman und Viel 1997).

Probleme bei der transkutanen Trachealspülung können durch eine Kontamination der Probe beim Verschieben des Katheters in die falsche Richtung oder durch Husten sowie den Verlust des Katheters durch Abschneiden an der Nadelspitze entstehen (Couetil und Thompson

2020a). Beim Vorliegen einer bakteriellen Infektion kommt es häufig zur Abszessbildung am Ort der Stichinzision (Couetil und Thompson 2020a).

Eine Trachealspülprobe erscheint makroskopisch wolkig mit großen Mengen an Mukus und Debris (Bain 1997).

2.7.1.3 Durchführung der Bronchoalveolären Lavage

Auch die BAL kann unterschiedlich durchgeführt werden. Die Proben können mit Hilfe eines Endoskops oder in blinder Art und Weise mit einer BAL-Sonde gewonnen werden (Hewson und Viel 2002). Zur Durchführung der BAL gibt es verschiedene Möglichkeiten, wobei es wichtig ist ein standardisiertes Protokoll innerhalb der Klinik zu befolgen, da sich Unterschiede in der Entnahmetechnik auf das Ergebnis der zytologischen Untersuchung auswirken können (s. Kap. 2.7.5.).

Die BAL wird am stehenden und sedierten Pferd durchgeführt. Die Sedation führt dazu, dass die Pferde die Manipulation besser tolerieren und sich wehrhafte Tiere bei der Probenentnahme nicht verletzen. Dafür können α 2-Agonisten in Kombination mit Butorphanol (Analgetikum aus der Opioidgruppe) genutzt werden, um die Hustenantwort zu mildern (Hewson und Viel 2002).

Die Vorteile der endoskopischen Technik liegen in der gleichzeitigen Beurteilung der Atemwege sowie der Möglichkeit zur visuellen Dokumentation (s. TBS) (Hewson und Viel 2002). Außerdem ist es möglich, sich einen Lungenflügel zur Beprobung auszusuchen (McGorum und Dixon 1994). Der BAL-Schlauch dagegen ist anwenderfreundlicher und länger als das Endoskop, sodass er auch gut bei großen Pferden genutzt werden kann (McGorum und Dixon 1994). Das Endoskop sollte 200-250cm lang sein und einen Außendurchmesser von 10-13 mm haben, sodass ein Vorschieben bis in einen Bronchus der 4.-6. Generation möglich ist (Couetil et al. 2016; Hewson und Viel 2002; Mazan 2018). Die BAL-Sonde sollte ca. 250 cm lang sein (Block et al. 2011).

Um das Risiko der Bronchokonstriktion und Husten bei der Probennahme zu vermindern, können Bronchodilatoren inhalativ verabreicht werden (Hoffman 2008). Albuterol (1 μ g/kg) wurde dafür vorgeschlagen (Couetil und Thompson 2020a). Hustenrezeptoren befinden sich unter anderem im Bereich der Bifurcatio tracheae wo ein topisches Lokalanästhetikum (0,4% Lidocain in steriler Kochsalzlösung - 60-120ml) aufgetragen werden kann (Hewson und Viel 2002). Eine signifikante Reduktion der Hustenintensität konnte bei einer intratrachealen Administration von 0,66%igem Lidocain oder einer intravenösen Gabe von Butorphanol erreicht werden (Westermann et al. 2005).

Das Endoskop oder die BAL-Sonde werden wie eine Nasenschlundsonde durch den ventralen Nasengang bis zum Kehlkopf vorgeschoben (Hoffman 2008). Dort wird durch Strecken der Kopf-Hals-Region ein Vorschieben in die Trachea erleichtert (Couetil und Thompson 2020a;

Hoffman 1999, Hoffman 2008). Bei der blinden Probennahme mit der BAL-Sonde kann die korrekte Position der Sonde durch verschiedene Maßnahmen überprüft werden: Die Möglichkeit Luft anzusaugen, das Fehlen von Schluckbewegungen, widerstandsloses Vorschieben, die fehlende Möglichkeit den Schlauch im Ösophagus zu palpieren und das Klopfen der Sonde gegen die Trachealspangen durch Bewegung in der Trachea bestätigen die richtige Position der BAL-Sonde (Couetil und Thompson 2020a; Hoffman 1999, Hoffman 2008). Das Endoskop oder die BAL-Sonde werden bis zu einem leichten Widerstand vorgeschoben, der die eingeklemmte Position des Schlauchs oder Endoskops in einem Bronchus der 4.-6. Generation bestätigt (Hoffman 2008). Der Cuff der BAL-Sonde wird mit ca. 5ml Luft aufgeblasen, um den Bronchus abzudichten (Hoffman 2008). Bei blindem Vorschieben gelangt die BAL-Sonde häufig in den rechten, kaudalen Lungenlappen (Couetil und Thompson 2020a; McGorum und Dixon 1994).

Es gibt die Möglichkeit einen Dreiwegehahn auf die BAL-Sonde aufzusetzen um die Instillation und Aspiration der Flüssigkeit zu erleichtern (Kreling und Ueberschär 2003). Die Lavage erfolgt mit ca. 37°C angewärmter steriler 0,9% Kochsalzlösung oder phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) um weniger Bronchospasmus und eine bessere Rückgewinnungsrate zu gewährleisten (Hewson und Viel 2002). Außerdem verhindert der physiologische pH-Wert der PBS-Lösung eine Schädigung der gewonnenen Zellen sowie des Bronchialepithels (Block et al. 2011).

In der Literatur werden unterschiedliche Mengen an Lavageflüssigkeit für die BAL angegeben. Die aktuellen zytologischen Referenzwerte für die BAL, im Consensus Statement für IAD festgelegt, beruhen auf der Instillation von 250 ml physiologischer Kochsalzlösung, wobei bei einer Verwendung von 500 ml die Referenzwerte angepasst werden müssen (Couetil et al. 2016). Weitere Angaben liegen bei 200-500 ml, 200-250 ml, 200-300 ml, 300-500 ml (Barton et al. 2007; Couetil und Thompson 2020a; Hewson and Viel 2002; Hoffman 2008; Robinson 2001). Generell sollte immer die gleiche Menge an Flüssigkeit verwendet werden, um eine valide Interpretation der Ergebnisse und Verlaufsuntersuchungen zu gewährleisten (Orard et al. 2016). Die Flüssigkeit kann in 1-3 Aliquoten mit leichtem Druck mittels Spritzen oder Druckpumpe instilliert werden (Hoffman 1999, Hoffman 2008; Robinson 2001). Die Aufteilung der Flüssigkeit in mehrere Aliquote wird in Kapitel 2.7.5. besprochen.

Es sollte nur leichter Unterdruck bei der Rückgewinnung der Flüssigkeit genutzt werden, um einen Kollaps der Atemwege und dadurch eine verringerte Menge der zurück gewonnenen Flüssigkeit zu verhindern und das Bronchialepithel nicht zu schädigen (Hewson und Viel 2002). Bei einer Studie zur BAL-Entnahme beim Hund konnte festgestellt werden, dass eine Saugpumpe mit maximal 50 mmHg eine signifikant höhere Rückgewinnungsrate erzielte als eine manuelle Aspiration (Woods et al. 2014).

Ursachen, die zu einer verminderten Rückgewinnungsrate führen, können ein verkeiltes Endoskop oder BAL-Sonde an einer Bifurcation sein, eine Dislokation der Sonde/Endoskops in einen anderen Bronchus während des Hustens, eine Lokalisation im Ösophagus oder eine Retroflexion der Sonde oder des Endoskops (Hewson and Viel 2002; McGorum und Dixon 1994; Stanzel 2013). Hierbei kann eine Aspiration während des langsamen Zurückziehens von Vorteil sein (McGorum und Dixon 1994).

Die Rückgewinnungsrate liegt in der Literatur bei 40-70%, wobei diese bei Pferden mit starkem Bronchospasmus verringert ist (Couetil und Thompson 2020a; Hewson and Viel 2002; Jean et al. 2011).

Die gewonnene Flüssigkeit wird zunächst makroskopisch auf das Vorhandensein von Schaum und Trübung beurteilt, wobei eine erhöhte Trübung der Flüssigkeit auf eine hohe Zellularität schließen lässt (Hoffman 2008). Eine pink-rote oder gelb-braune Färbung kann Hinweise auf eine vorangegangene Blutung geben (Hoffman 2008). Sollte sich die Flüssigkeit ohne Schaum (*Surfactant*) darstellen oder nur eine geringe Rückgewinnungsrate (<20ml) bestehen, lässt dies auf eine fehlerhafte Probenentnahme schließen (Hewson und Viel 2002; Stanzel 2013).

Nach der BAL sollten die Pferde während 24 Stunden nicht belastet werden, da es zu einer Erhöhung der inneren Körpertemperatur kommen kann (Hoffman 2008; McGorum und Dixon 1994). Auch in der Humanmedizin sind ein transientes, selbstlimitierendes Fieber zusammen mit einer verminderten Lungenfunktion die häufigsten Komplikationen (Stanzel 2013).

2.7.2 Probenbearbeitung und Fehlerquellen

2.7.2.1 Zeit bis zur Probenbearbeitung

Die Proben des TBS sowie der BAL sollten möglichst direkt nach der Probenentnahme weiterbearbeitet werden (Pickles et al. 2002c; Wenisch et al. 2001). Eine Lagerung der nativen BAL von über 8 Stunden oder bei hohen Temperaturen führt zu einer Verringerung in der Gesamtzellzahl, zu Veränderungen in der Morphologie und auch zu Veränderungen in der Differentialzellzählung (Nafe et al. 2011; Pickles et al. 2002c; Wenisch et al. 2001). Eine Studie zur BAL bei Katzen zeigte, dass eine Lagerung über 24 Stunden bei Raumtemperatur zu einer erhöhten Anzahl an eosinophilen Granulozyten vermutlich bedingt durch die gleichzeitig verringerte Anzahl an neutrophilen Granulozyten führte (Nafe et al. 2011). Bei allen gelagerten Proben kam es zu Veränderungen der Zellmorphologie und folglich in 31-57% der Fälle zu einer veränderten zytologischen Diagnose was mit der Lagerungszeit und Temperatur zunahm (Nafe et al. 2011). Neutrophile Granulozyten neigen nach einigen Stunden dazu ein degeneriertes Aussehen anzunehmen (Mazan 2018). Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass auch bei einer Lagerung von 4°C ohne Zusatz nach 8 Stunden nur noch 73% der Ausgangswertes an neutrophilen Granulozyten vorhanden war (Wenisch et al. 2001). Eine

Lagerung bei Raumtemperatur führt nach 8 Stunden bereits zu einer verringerten Zellqualität und gleichzeitig bei nicht fixierten Proben nach 8 Stunden zu einem Anstieg des bakteriellen Wachstums (Cian et al. 2015; Pickles et al. 2002c; Wenisch et al. 2001). Daher sollten die Proben, die erst nach >8 Stunden bearbeitet werden können, bei 4°C gekühlt gelagert werden, sowie Proben, die erst nach 24 Stunden bearbeitet werden, fixiert werden (Cian et al. 2015; Pickles et al. 2002c; Wenisch et al. 2001). In der Humanmedizin wird sogar bei einer verzögerten Probenbearbeitung ab 30-60 Minuten ein gekühlter Transport empfohlen (Meyer et al. 2012). Bei einer Verzögerung um mehr als eine Stunde sollen die Proben zentrifugiert, mit einem nährstoffreichen Medium resuspendiert und gekühlt gelagert werden (Meyer et al. 2012). So soll eine Lagerung bis zu 24 Stunden ermöglicht werden, ohne eine Zentrifugation ist dies allerdings nur für 12 Stunden möglich (Meyer et al. 2012).

Eine weitere Studie zeigt, dass es bei der Lagerung von nativer BAL nach 24 Stunden bei Raumtemperatur oder erhöhten Temperaturen von 37°C, wie sie durchaus bei einem Transport ins Labor auftreten können, zu bakteriellem Wachstum und falschen mikrobiologischen Ergebnissen kommen kann (Curran et al. 2020). Bei einer Lagerung über 24 Stunden bei 4°C kam es zu keinem bakteriellen Wachstum und somit den gleichen mikrobiologischen Ergebnissen wie bei einer direkten Bearbeitung der Proben (Curran et al. 2020). Eine bakterielle Überwachung des Objektträgers kann fälschlicherweise zu der Diagnose einer septischen Infektion führen sowie eine Beschädigung anderer Zellen verursachen (Mazan 2018). Darüber hinaus kann es bei iatrogenem Trauma während der Probenentnahme und verzögerter Bearbeitung der Probe zu einer Phagozytose von Erythrozyten und eventuell zu der falschen Diagnose einer pulmonalen Blutung kommen (Mazan 2018). Häufige Fehler bei der Probenübermittlung an die Labore sind eine starke Beschädigung der Zellen (Zytolyse) sowie eine Vermehrung bakterieller Erreger (Kreling und Ueberschär 2003).

Silikonbeschichtete Behältnisse oder Plastikbehältnisse sind für die Aufbewahrung und den Transport der Proben empfohlen, um den Verlust der Zellen durch Adhäsion an Glas zu vermeiden (Meyer et al. 2012; Stanzel 2013). Bei Bedarf sollte eine Probe von 5-10 ml der BAL in einem EDTA Röhrchen ohne weitere Zusätze von Formalin und Alkohol zusammen mit bereits angefertigten Ausstrichen der frischen BAL an ein Labor geschickt werden (Couetil und Thompson 2020a; Hoffman 2008). Dabei dient das EDTA Röhrchen nicht der Konservierung der Probe, sondern zur Verhinderung der Gerinnung (Couetil und Thompson 2020a; Hoffman 2008).

Der Zusatz von Formalin oder alkoholbasierten Fixiermitteln zur Konservierung der Proben führt zu einer Veränderung der Morphologie der Zellen (Pickles et al. 2002c; Wenisch et al. 2001). Diese wirken zusammengezogen, kleiner und dunkler gefärbt (Pickles et al. 2002c; Wenisch et al. 2001). Dadurch wird die Identifikation der Zellen erschwert (McGorum und

Dixon 1994). Probleme können hier unter anderem bei der Differenzierung von Lymphozyten und Makrophagen entstehen, da die Makrophagen verkleinert erscheinen und das Zytoplasma stärker angefärbt wird (Wenisch et al. 2001). Die veränderte Morphologie kann ebenfalls durch die Kombination mit einer Romanowsky Färbung entstehen, da sie Formalin-fixierte Ausstriche anders anfärbt (Horobin und Walter 1987). Formaldehyd und Alkohol haben verschiedene chemische und physikalische Effekte auf Zellen (Horobin und Walter 1987). Durch chemische Modifikation zellulärer Proteine inhibiert Formalin die Aufnahme des sauren Farbstoffes Eosin Y und verstärkt die Aufnahme des basischen Farbstoffes Azur B und führt so zu einer dunkelblauen Zellfärbung, wobei Alkohol zu einer Zellzerstörung führt und so für eine schnelle Aufnahme des Farbstoffes und einer dunkelvioletten Erscheinung der Zellen führt (Horobin und Walter 1987). Daher kann nach einer Zugabe von Formalin oder Alkohol keine Romanowsky Färbung mehr genutzt werden (Mazan 2018).

2.7.2.2 Zentrifugation der Proben

Die BAL sowie die Trachealspülprobe sind von geringer Zellularität, sodass für eine zytologische Analyse ohne weitere Bearbeitung nicht ausreichend Zellen vorhanden sind (Couetil und Thompson 2020a; Hewson and Viel 2002). Daher werden die Proben vor der Anfertigung zytologischer Ausstriche zentrifugiert (Couetil und Thompson 2020a; Hewson and Viel 2002; May und Gehlen 2009). In der Humanmedizin und Veterinärmedizin wird vorher von einigen Autoren eine Filtration der Flüssigkeit durch Baumwollgaze oder ein Nylonnetz zur Reduktion muköser Substanzen empfohlen (Couetil und Thompson 2020a; Meyer et al. 2012; Stanzel 2013). Große Mengen an mukösen Substanzen können die Zellzählung stören, weswegen eine Filtration angezeigt sein kann (Kelly et al. 1989). Eine Filtration durch ein Stahlnetz führt zu einer Entfernung von Mukus allerdings auch zum Verlust einer großen Anzahl an Makrophagen, einiger Epithelzellen und neutrophiler Granulozyten (Kelly et al. 1989). Dabei ist der Anteil der entfernten Zellen abhängig vom Anteil des Mukus in der Probe (Kelly et al. 1989). Eine Filtration durch Baumwollgaze führt zu einer Verringerung der Gesamtzellzahl und zu einem Verlust von Lymphozyten, was zu einer Veränderung der Differenzialzellzählung führt (Baughman 2007; Milman et al. 1993). Aus diesen Gründen sollte aus Sicht anderer Autoren die Filtration der BAL vermieden werden (Baughman 2007; Milman et al. 1993). Des Weiteren konnten bei der Filtration von TBS durch hydrophile Gaze ebenfalls Veränderungen in der Differentialzellzählung in Form eines signifikanten Verlustes an neutrophilen Granulozyten und einer Erhöhung an Makrophagen dargestellt werden (Santos et al. 2016). Daher wird die Filtration des TBS nicht empfohlen (Santos et al. 2016).

Es kann zwischen einer Zentrifugation mit anschließender manueller Anfertigung eines Ausstrichs und einer Zytozentrifugation unterschieden werden. Bei der Zytozentrifugation werden die Zellen durch Zentrifugalkraft direkt auf den Objektträger platziert (De Brauer et al

2000b). Die Vorteile eines Zytospinpräparats liegen in der besseren Qualität des Ausstrichs durch eine homogene Verteilung der Zellen, einer besseren Morphologie sowie einer höheren Anzahl an Zellen, die zur Beurteilung herangezogen werden können (Dehard et al. 2008; Lapointe et al. 1994; Pickles et al. 2002b).

Für die Zentrifugation sind verschiedene Geschwindigkeiten und Zeiten in der Literatur beschrieben (600-800 g für 10 min, 500 g für 5-10 min, 328 g für 6 min, 300 g für 5 min) (Couetil und Thompson 2020a; Hewson and Viel 2002; May und Gehlen 2009; Mazan 2018). Ein Problem eingesandter Ausstriche kann eine zu geringe Zellularität verursacht durch eine fehlende Zentrifugation der Probe oder auch durch eine fehlende Resuspension der Flüssigkeit vor der Zentrifugation sein (Kreling und Ueberschär 2003). Außerdem ist bei viskösen Sekreten eine verlangsamte Sedimentation beschrieben, sodass das Bodensediment bei der Entfernung des Überstandes leicht mit entfernt werden kann (Kreling und Ueberschär 2003).

Bei der Zytozentrifugation kommt es bei höheren Geschwindigkeiten zu einer höheren Anzahl an Lymphozyten und einer geringeren Zahl an Makrophagen als bei geringeren Geschwindigkeiten (De Brauwer 2000b; Mordelet-Dambrine 1984), wobei eine optimale Zytozentrifugation für die Gewinnung von Lymphozyten bei einer Geschwindigkeit von 1200 rpm für 10 min in der Humanmedizin vorgeschlagen wurde (De Brauwer 2000b).

Bei einem Vergleich zwischen Zytospin- und Ausstrichpräparaten konnten signifikante Unterschiede in der Differentialzellzählung festgestellt werden, wobei die Zytopräparationen bei 100 xg für 5 Minuten durchgeführt wurden und die Zentrifugationen bei 100-400 xg (Wenisch et al. 2001). Insgesamt wurden bei den Ausstrichpräparaten signifikant höhere Anteile an Lymphozyten (12,1-20,1% mehr) und geringere Anteile an neutrophilen Granulozyten (Mittelwert Zytopräparation 8,7%, Ausstrichpräparat 1,9%), schaumigen Alveolarmakrophagen (27,8-53,1% weniger) und Mastzellen festgestellt (Wenisch et al. 2001). Keine Unterschiede in der Differentialzellzählung gab es bei den Alveolarmakrophagen und eosinophilen Granulozyten (Wenisch et al. 2001). In weiteren Studien konnten ebenfalls ein selektiver Verlust an Lymphozyten (durchschnittlich 10,1% weniger) und höhere Zahlen an Makrophagen (durchschnittlich 10,5% mehr) bei der Zytozentrifugation im Vergleich zur Ausstrichmethode festgestellt werden, allerdings wurden keine signifikanten Unterschiede bei den neutrophilen Granulozyten beobachtet (Lapointe et al. 1994; Pickles et al. 2002b).

Die Diskrepanz der Zellzahlen wurden unter anderem dadurch begründet, dass Makrophagen mehr als andere Zellen bei geringer Zentrifugationsgeschwindigkeit am Objektträger anhaften und so in höheren Anteilen vorkommen und Veränderungen in der Differentialzellzählung mit sich bringen (Mordelet-Dambrine et al. 1984). Weitere Autoren ordnen die Veränderungen in der Lymphozytenanzahl nicht der Zytozentrifugation sondern verschiedenen Fixierungen und chemischen Färbecharakteristika zu (wasser- oder alkoholhaltig) zu (Moumouni et al. 1994).

Ein luftgetrockneter Ausstrich wurde mit einer wasserhaltigen Lösung (Diff Quik Färbung) gefärbt und zeigte einen größeren Verlust an Lymphozyten als Spray fixierte Ausstriche, die mit einer alkoholhaltigen Lösung gefärbt wurden (Moumouni et al. 1994).

Die klinische Relevanz der veränderten Lymphozytenanzahl ist jedoch fraglich (Hewson und Viel 2002; Pickles et al. 2002b). Aufgrund der Veränderungen innerhalb einzelner Zellpopulationen wird empfohlen immer dieselbe Technik zur Anfertigung zytologischer Präparate zu verwenden (Baughman 2007; Dehard et al. 2008; Wenisch et al. 2001).

Bei manuellen Ausstrichen von Zellpellets nach der Zentrifugation kann es zu einer heterogenen Verteilung der Zellen und einer vermehrten Zelllyse kommen (Dehard et al. 2008). Geringe Geschwindigkeiten bei der Zytozentrifugation erzeugen die besten zytomorphologischen Ausstriche (De Brauwier 2000b). Zwar wird die Anfertigung eines Zytospinpräparates für die zytologische Untersuchung empfohlen, dennoch sollten zusätzlich Ausstriche aus dem Zellpellet angefertigt werden, da Zytospinpräparate oft keine schleimhaltigen Substanzen enthalten, die allerdings weiteres zelluläres und nicht-zelluläres Material enthalten (Hewson und Viel 2002). Da eine Zytozentrifuge nicht immer zur Verfügung steht, wurde eine kostengünstige, manuell zu betätigende, alternative Zentrifuge aus einer Salatschleuder vorgeschlagen, die ähnlich gute zytologische Präparationen herstellt (Marcos et al. 2016).

Ein weiteres Problem bei respiratorischen Sekreten stellt eine geringe Proteinkonzentration dar, was die Zellen fragil macht, sodass besonders Lymphozyten schnell zerstört werden (Mazan 2018). Die Zugabe von Serum kann beim Überleben der Zellen helfen und zu einer besseren Morphologie führen (Mazan 2018; Pickles et al. 2002b).

2.7.2.3 Ausstrichmethode, Fixierung und Trocknung der Proben

Nach der Zentrifugation bildet sich am Boden des Röhrchens ein Zellpellet mit dem darüber liegenden Überstand (Couetil und Thompson 2020a; Hewson und Viel 2002). Der Überstand wird dekantiert und das Zellpellet mit der restlichen Flüssigkeit resuspendiert (Couetil und Thompson 2020a; Hewson und Viel 2002). Es gibt die Möglichkeit direkt aus der frischen Probe (Aspiration von TBS) oder aus dem Sediment der konzentrierten Probe (BAL oder Trachealspülprobe) zytologische Ausstriche anzufertigen (Barton et al. 2007). Hierzu werden unterschiedliche Ausstricharten beschrieben, wobei man unter anderem zwischen der Quetschtechnik und der Blutausstrichmethode unterscheiden kann (Barton et al. 2007). Bei der Quetschtechnik wird die Probe auf einen Objektträger gegeben und ein zweiter Objektträger darauf platziert, sodass die Probe unter dem zweiten Objektträger verteilt wird (Tyler et al. 2001). Es sollte allerdings darauf geachtet werden, nicht zu viel Druck auszuüben, um eine Ruptur der Zellen zu verhindern (Tyler et al. 2001). Diese Technik sorgt vor allem bei viskösen Proben für eine gute Verteilung (Tyler et al. 2001). Bei der zweiten Methode kann

der Ausstrich ähnlich wie ein Blutausstrich angefertigt werden, indem am Ende des Objektträgers ein Tropfen der Probe aufgetragen wird und mithilfe eines zweiten Objektträgers, welcher im 30-45° Winkel an die Probe angelegt wird, schnell und leicht ausgestrichen wird (Tyler et al. 2001; Pickles et al. 2002b). Auf diese Weise soll am Ende eine Fahne entstehen (Tyler et al. 2001; Pickles et al. 2002b). Bei einer modifizierten Version kann die Probe über 2/3 oder 3/4 des Objektträgers ausgestrichen werden, dann der zweite Objektträger hochgenommen werden, sodass eine Linie mit konzentrierter Dichte an Zellen entsteht anstatt einer Fahne am Ende des Ausstrichs (Tyler et al. 2001). Diese Durchführung konzentriert die Probe an der Linie, sodass man diese Ausstrichtechnik nutzen kann, wenn auch die Zentrifugation nicht ausreicht (Tyler et al. 2001). Des Weiteren wird vorgeschlagen, einen Tupfer in die Probe einzutauchen und diesen auf einem Objektträger auszurollen (Mazan 2018; Mazan und Hoffman, 2003). Die Zellularität, Viskosität und Homogenität der Probe bestimmt die Auswahl der Ausstrichtechnik (Tyler et al. 2001). Die Ausstrichmethode ist eine gute Alternative für Praktiker, anstatt die BAL direkt an das Labor zu schicken (Pickles et al. 2002b). Diese weist allerdings im Vergleich zu Zytospinpräparationen eine schlechtere Zellmorphologie in Form kleiner und dunkel gefärbter Zellen auf (Pickles et al. 2002b). Dies erschwert zum einen die Identifikation besonders kleiner Zellen und verlängert darüber hinaus die Auswertungszeit (Pickles et al. 2002b). Eine Studie aus der Humanmedizin zum Vergleich der Ausstrichmethode mit der Zytozentrifugation erzielte eine gute morphologische Qualität und eine höhere Anzahl an Lymphozyten bei der Ausstrichmethode (Thompson et al. 1996). Sie kamen zu dem Schluss, dass die Ausstrichmethode eine einfache und gute Methode zur Quantifizierung der Zellen darstellt (Thompson et al. 1996).

Ziel bei allen Ausstricharten ist die Anfertigung einer einlagigen Schicht von Zellen (Mazan 2018). Ein häufiger Fehler beim Anfertigen von Ausstrichen ist das Auftragen von zu viel Probenmaterial (Kreling und Ueberschär 2003). Nur wenn das Probenmaterial in dünner Schicht aufgetragen ist, spreizen sich die Zellen ausreichend, um auch nach der Färbung eine gute Erkennbarkeit einzelner Zellstrukturen zu gewährleisten (Kreling und Ueberschär 2003). Andernfalls bleiben die Zellen kugelig und färben sich stärker an (Couetil und Thompson 2020a; Kreling und Ueberschär 2003). Bei zu dick angefertigten oder besonders schleimhaltigen Ausstrichen vor allem des TBS kann es zu einem langsamen Wasserverlust der Zellen bei der Lufttrocknung kommen, wobei sich Veränderungen der Morphologie ergeben, sodass die Differenzierung der Zellen erschwert sein kann (Couetil und Thompson 2020a; Kreling und Ueberschär 2003). Daher kann auch ein Föhn oder ein Brutschrank zur Trocknung verwendet werden (Couetil und Thompson 2020a; Kreling und Ueberschär 2003). Während der Lufttrocknung kommt es zur Spreizung der Zellkerne auf der Oberfläche des Objektträgers, sodass eine Abflachung des dreidimensionalen Kerns und die Vergrößerung der Zellen und Kerne erreicht wird (Krafts und Pambuccian 2011; Schulte 1986).

Nach der Anfertigung der Ausstriche, können die Zellen fixiert werden, um einer Autolyse und einer Degeneration durch Bakterien und Pilzen entgegenzuwirken (Greenstreet et al. 2002). Außerdem wird dem Verlust von Zellbestandteilen vorgebeugt und die Zellmembran permeabel für die Farbstoffe gemacht (Greenstreet et al. 2002). Die angefertigten Ausstriche können entweder an der Luft trocknen oder durch eine Feuchtfixierung mit 95% Ethanol oder ähnlichen Fixiermitteln oder mittels Alkohol- und Polyethylenglykol-haltigem Spray fixiert werden (Jörundsson et al. 1999; Greenstreet et al. 2002). Außerdem gibt es die Möglichkeit der Rehydrierung luftgetrockneter Ausstriche, was eine ähnliche morphologische Qualität bietet wie die Feuchtfixierung (Jörundsson et al. 1999). Die in der Tiermedizin oft verwendete Lufttrocknung der Ausstriche wird in Zusammenhang mit Romanowsky Färbungen benutzt (Jörundsson et al. 1999). In der Zytologie der Humanmedizin wird häufig die Papanicolaou Färbung genutzt, die zusammen mit einer Feuchtfixierung durch Ethanol oder einer Sprayfixierung mit Polyethylenglykol verwendet wird (Greenstreet et al. 2002). Bei einem Vergleich verschiedener Fixierungsmöglichkeiten (Lufttrocknung, Sprayfixierung, Inkubation luftgetrockneter Ausstriche in Methanol und Aceton) von Ausstrichen der BAL wurden bei der Feuchtfixierung mit einem Ethanol- und Propanolol-haltigem Spray bessere morphologische Ergebnisse erzielt als bei der häufig verwendeten Lufttrocknung (Bertram et al. 2018). Die Sprayfixierung wurde direkt im Anschluss der Zytozentrifugation nach Herstellerangaben durchgeführt (Bertram et al. 2018). Dazu wurde drei Mal im Abstand von 15-20 cm auf den feuchten Ausstrich gesprüht. Die besseren Ergebnisse der Sprayfixierung wurden durch das Verhindern von Trocknungsartefakten bei der Feuchtfixierung begründet (Bertram et al. 2018). Außerdem kam es bei der Spray Fixierung zur Zunahme in der Zellgröße bei neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Mastzellen was eine schnellere und validere Identifizierung erlaubte (Bertram et al. 2018). Fixierungen luftgetrockneter Ausstriche mit Aceton und Methanol führten zu einer schlechteren Zellmorphologie als bei unfixierten luftgetrockneten Ausstrichen (Bertram et al. 2018). Besonders bei der Methanolfixierung kam es zu starken Veränderungen der Makrophagenmorphologie (Bertram et al. 2018). Darüber hinaus wurde festgestellt, dass ungefärbte Zytospinpräparate bei Raumtemperatur für bis zu 7 Tage ohne Verlust der Zellqualität unabhängig von der Fixierungsmethode gelagert werden können. Dies gilt auch für luftgetrocknete Ausstriche (Barton et al. 2007; Bertram et al. 2018). Es sollte außerdem vor dem Transport luftgetrockneter Präparate auf eine ausreichende Trocknung geachtet werden, da es sonst zu bakteriellem Wachstum und Freisetzung lytischer Enzyme durch Erreger kommen kann (Kreling und Ueberschär 2003).

2.7.2.4 Färbung der Ausstriche

Zur Färbung der zytologischen Ausstriche von TBS und BAL werden in der Veterinärmedizin meist Romanowsky Färbungen herangezogen (Jörundsson et al. 1999). Dies sind Färbungen die Azur B und/oder polychromes Methylenblau und Eosin enthalten (Horobin 2011; Wittekind 1979).

Die Färbung der basophilen oder azidophilen Zellstrukturen entsteht durch die komplementäre Anfärbung mittels saurer und basischer Farbstoffe (Horobin 2011; Pischinger 1925). Die Färbung basophiler oder auch saurer Strukturen wie die DNA, RNA oder das ribosomenreiche Zytoplasma erfolgt durch den basischen Farbstoff Azur B oder Methylenblau und die Färbung basischer oder auch azidophiler Proteine durch den sauren Farbstoff Eosin Y (Horobin 2011; Pischinger 1925). Dieser Effekt erklärt den Einfluss des pH-Wertes der Lösung auf die Aufnahme der Farbstoffe (Binder et al. 2012; Horobin 2011; Pischinger 1925).

Bei den Romanowsky Färbungen kommt es zum Romanowsky oder auch Romanowsky-Giemsa Effekt wobei eine weitere Farbe durch die gemeinsame Einwirkung von Azurfarbstoffen und Eosin entsteht (Horobin 2011; Jörundsson et al. 1999; Wittekind 1979; Wittekind et al. 1976). Eine leuchtend rötlich-violette Färbung der Zellkerne, bestimmter Granula, des Mukus und Kollagengewebes entsteht (Horobin 2011; Jörundsson et al. 1999; Wittekind 1979; Wittekind et al. 1976). An bestimmten Stellen kommt es zur Anlagerung und Dimerbildung von Azur B und anschließend zur Komplexbildung mit Eosin Y und damit zu einer neuen Wellenlänge und Farbe (Binder et al. 2012; Wittekind 1979). So entsteht der Effekt nicht durch Mischung der Farben, sondern durch das Entstehen einer neuen Farbe (Binder et al. 2012; Wittekind 1979). Durch oxidative Demethylierung zerfällt Methylenblau im alkalischen Milieu zu Azur B, Azur A, Azur C und Thionen und stellt daher die Ausgangssubstanz für die Gewinnung der Azurfarbstoffe dar (Wittekind et al. 1976). Der dabei entstehende starke Kontrast der lila gefärbten Zellkerne gegenüber dem blau gefärbten Zytoplasma führte zum Erfolg der Romanowsky Färbung (Wittekind 1979; Zipfel et al. 1981).

Die im Methylenblau enthaltenen Farbstoffe fallen bei Zugabe von Eosin in wässrigem Milieu aus, weswegen Lösungsmittel wie Methanol, Dimethylsulfoxid oder Glycerin den wässrigen Romanowsky Färbungen zur Reduktion der hydrophoben Effekte hinzugefügt werden (Horobin 2011).

Zu den Romanowsky Färbungen gehören die Wright, Leishman, May-Grünwald und Giemsa Färbung sowie Kombinationen der Färbungen (Garbyal et al. 2006; Horobin 2011; Jörundsson et al. 1999). Anfang des 20. Jahrhunderts wurde die panoptische Färbung nach Pappenheim auch genannt May-Grünwald-Giemsa Färbung, die aus den Romanowsky Färbungen hervorgeht, vorgestellt (Binder et al. 2012). Die Wright und Leishman Färbungen kommen eher im englischsprachigen Raum vor (Binder et al. 2012; Wittekind et al., 1976).

Die Pappenheimfärbung erlaubt eine gute Differenzierung der Leukozyten und Epithelzellen (Diekmann und Deegen 1990). Sie besteht aus einer Mischung von Azur B (blau), Eosin Y (rot) und polychromiertem Methylenblau und färbt wie auch die Romanowsky Färbungen besonders das Zytoplasma und metachromatische Granula gut an und stellt die Kernstruktur gut dar (Binder et al. 2012; Krafts und Pambuccian 2011). Ausstriche werden hierbei zunächst mit der alkoholischen May-Grünwald-Färbelösung (Eosin-Methylenblau) gefärbt (Binder et al. 2012; Thelm 2014). Der Romanowsky Effekt tritt bei der anschließenden Färbung mit der Giemsa Lösung ein (Azur-Eosin) (Binder et al. 2012; Thelm 2014). Die May-Grünwald-Giemsa Färbung ist eine exzellente zytoplasmatische Färbung stellt aber durch mehrere Arbeitsschritte, einen größeren Zeitaufwand sowie höhere Kosten Nachteile dar. (Garbyal et al. 2006).

Die Leishmanfärbung färbt Zellkerne und die extrazelluläre Grundsubstanz intensiv an, allerdings werden einzelne Zellen und zytoplasmatische Granula nur schwach angefärbt (Doddagowda et al. 2017). Bei der Giemsa Färbung kommt es zu einer guten zytoplasmatischen Färbung und einer schwachen Färbung der Zellkerne (Doddagowda et al. 2017). Einige Studien aus der Humanmedizin stellen eine Kombination aus der Leishman und Giemsa Färbung vor. Diese Färbung erzielt eine gute Qualität in der panoptischen Färbung mit guten zellulären und extrazellulären Details sowie guter Färbequalität von zytoplasmatischen und extrazellulären Substanzen im Vergleich zur May-Grünwald-Giemsa Färbung (Belgaumi und Shetty 2013; Doddagowda et al. 2017; Garbyal et al. 2006). Vorteile dieser Färbung sind die ein-Schritt-Methode, eine Färbezeit von unter 10 Minuten, keine Notwendigkeit der Fixierung luftgetrockneter Ausstriche (in der Färbung enthalten) sowie ein geringerer Kostenaufwand (Belgaumi und Shetty 2013; Doddagowda et al. 2017; Garbyal et al. 2006).

Bei der Wright-Giemsa Färbung wird eine schwierige Identifikation von Makrophagen und Lymphozyten durch morphologische Ähnlichkeiten beschrieben (Robinson-Smith et al. 2004). So kann es zur Missklassifikation dieser Zellarten kommen (Robinson-Smith et al. 2004).

In der Tiermedizin häufig verwendet ist die Diff Quik Färbung, welche eine modifizierte, wasserhaltige Romanowsky Färbung darstellt (Allison und Velguth 2010; Robinson-Smith et al. 2004). Diese bietet den Vorteil, dass sie leicht und schnell anzuwenden ist. Sie besteht aus einer Methanol Fixierung, einer wasserhaltigen Lösung von Eosin Y und einer wasserhaltigen Lösung von Azur B/Methylenblau (Allison und Velguth 2010; Garbyal et al. 2006). Durch den wässrigen Charakter besteht die Gefahr das Granula der Zellen ausgewaschen werden können (Krafts und Pambuccian 2011). Darüber hinaus zeigt die Diff Quik Färbung keine metachromatische Reaktion, sodass Granula von Mastzellen nicht gefärbt werden (Tyler et al. 2001).

Einige Studien haben sich mit verschiedenen Färbe- und Fixierungsmethoden zur Darstellung von Mastzellen beschäftigt und kommen zum Resultat, dass eine Diff Quik Färbung nicht geeignet ist und hierfür metachromatische Färbungen wie z.B. die May-Grünwald-Giemsa (MGG) oder die Toluidinblau Färbung benötigt werden (Allison und Velguth 2010; Hughes et al. 2003; Leclere et al. 2006; Xaubet et al. 1991). Der Begriff Metachromasie wird verwendet, um die Fähigkeit eines Farbstoffs zu beschreiben, einer Substanz einen anderen Farbton zu verleihen als der des verwendeten Färbemittels (Kramer und Windrum 1954). Farbstoffe der Thiazinreihe wie Azur B oder Toluidinblau bilden Dimere, welche von den sauren mukopolysacchariden der Granula von Mastzellen oder basophilen Granulozyten gebunden werden und zu einem anderen Absorptionsspektrum und daher zu einer anderen Farbe führen (Binder et al. 2012; Kramer und Windrum 1954; Leclere et al. 2006).

Ein Vergleich verschiedener Fixierungsmethoden zeigte, dass nach einer Fixierung mit Formaldehyd nur wenige Mastzellen identifiziert werden konnten unabhängig von der nachfolgenden Färbung (Xaubet et al. 1991). Die Toluidinblau Färbung stellt die zytoplasmatischen Granula der Mastzellen rot-violett dar und andere Zellen in blassem blau (Leclere et al. 2006; Xaubet et al. 1991). Auf diese Weise ermöglicht die Färbung eine leichte Identifikation der Mastzellen und in Vergleich zu anderen Färbungen, auch der MGG, lässt sie die höchste Anzahl an Mastzellen erkennen (Leclere et al. 2006; Xaubet et al. 1991). Die Toluidinblau Färbung ist allerdings nicht geeignet zur Differenzierung anderer Zellarten (Hoffman 2008). Daher würde man für die zytologische Auswertung von TBS und BAL noch eine weitere Färbung benötigen (Hoffman 2008).

Generell hängen der Farbton und die Intensität der Färbung von vielen Parametern ab (Binder et al. 2012). Aufzuzählen sind unter anderem die Pufferung und der pH-Wert der Farblösung, die Konzentration der Farblösung, die Dauer der Färbung, der Zellreichtum bzw. die Schichtdicke des Ausstrichs, die Fixierung des Präparats (Formalin inhibiert die Anfärbbarkeit durch Eosin Y) sowie die Alterung der Farblösungen (Binder et al. 2012). Bei einer Lagerung der Ausstriche vor der Fixierung oder Färbung für 48 Stunden kommt es zu keiner wesentlichen Veränderung des Färbeverhaltens (Binder et al. 2012). Bei längerer Lagerung unfixierter Ausstriche kommt es nach zwei Wochen zu einem Verlust der Farbsättigung, sodass die Präparate blau-grau erscheinen und Rottöne weniger intensiv dargestellt werden (Binder et al. 2012).

Eine ungenügende Fixierung durch zu kurzen Aufenthalt in der Fixierlösung oder Verwässerung des Methanols kann dazu führen, dass dichte Areale unterfärbt werden (Binder et al. 2012). Bei einer Fixierung mit Formaldehyd werden Erythrozyten grau-blau dargestellt und das Zytoplasma wird kaum angefärbt (Binder et al. 2012). Zu einer schwachen Färbung der Zellstrukturen kann es u.a. bei alten Färbelösungen, falschen Färbezeiten oder Farbstoffkonzentrationen oder zu später Färbung der Ausstriche kommen (Binder et al. 2012).

Da Wasser und Alkohol verdunsten und man so eine unklare Farbstoffkonzentration erhält, sollte man die Färbelösungen regelmäßig austauschen (Mazan 2018). Präzipitate auf den Präparaten können u.a. durch eine nicht ausreichende Waschung der Ausstriche nach der Färbung, durch verschmutzte Objektträger oder durch Trocknung der Färbemittel während des Färbens entstehen (diese sollten nicht zu lange auf dem Ausstrich belassen werden, sondern zügig abgespült werden) (Tyler et al. 2001). Bei einer zu blauen Färbung der Ausstriche kann ein zu langer Färbekontakt, unzureichendes Waschen, ein zu dick aufgetragenes Probenmaterial oder ein alkalischer pH-Wert des Färbemittels, Puffers oder Waschwassers ursächlich sein (Tyler et al. 2001).

2.7.3 Vorgehen bei der zytologischen Untersuchung – Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

Die zytologische Untersuchung von TBS und BAL erfolgt mittels Lichtmikroskop in unterschiedlichen Vergrößerungen (Hewson und Viel 2002; Mazan 2018). Bei geringer Vergrößerung wird sich bei beiden Probenarten zunächst ein Überblick über die Zellverteilung verschafft und auf die Verteilung schleimhaltiger Substanzen geachtet (Hewson und Viel 2002; Mazan 2018). Diskrepanzen in der Zellverteilung ergeben sich häufig in Zusammenhang mit Mukussträngen, da dort viele Entzündungszellen enthalten sind, die an anderen Stellen nicht in dieser Quantität zu finden sind (Hewson und Viel 2002). Besonders im TBS kann es zu einer inhomogenen Sekretzusammensetzung in unterschiedlichen Ausstrichabschnitten kommen (Diekmann und Deegen 1990; May und Gehlen 2009). Daher wird beim TBS empfohlen mindestens zwei Ausstriche sowie ausreichend viele Zellen zu beurteilen (Barton et al. 2007; Diekmann und Deegen 1990; May und Gehlen 2009). Ebenso sollte jeder Abschnitt des Ausstrichs in die Beurteilung einfließen, um ein repräsentatives Ergebnis zu erzielen (Hewson und Viel 2002). Anschließend werden die Ausstriche in 500-1000-facher Vergrößerung mit Ölimmersion beurteilt (Barton et al. 2007; Hewson und Viel 2002). Der Funktionszustand der Zellen sowie Hintergrundmaterialien werden ebenfalls beurteilt (Barton et al. 2007; Couetil und Thompson 2020a).

Bei der TBS-Analyse wird das Vorkommen einzelner Zellpopulationen meist semiquantitativ angegeben, da eine exakte quantitative Bestimmung der Zellpopulationen oft schwierig ist (Barton et al. 2007; Dixon 1997; May und Gehlen 2009). Semiquantitative Angaben beruhen auf der subjektiven Schätzung einer Menge (hier der Menge einer Zellart am gesamten Zellbild) durch einen Untersucher und sind nicht so genau wie quantitative Angaben, die in Zahlenwerten ausgedrückt werden.

Bei der BAL werden quantitative Angaben zum Vorkommen einer Zellart angegeben (Couetil und Thompson 2020a). Dafür wird empfohlen 400-500 kernhaltige Zellen für die Differenzialzellzählung auszuzählen und anschließend die Anteile einer Zellart am

Gesamtzellbild in Prozent anzugeben (Cian et al. 2015; Couetil und Thompson 2020a; Hoffman 2008). Andere Autoren empfehlen mindestens 200-300 Zellen zu zählen (Hewson und Viel 2002).

In der Humanmedizin wurde vorgeschlagen bei Zytopräparaten in zirkulärer Art und Weise um das Zentrum des zytozentrifugierten Spots zu zählen anstatt einzelner Quadranten, da Lymphozyten und Makrophagen ungleichmäßig auf dem Objektträger verteilt sind und die Differenzialzellzählung zwischen den Quadranten variiert (De Brauwer et al. 2000a). Des Weiteren wurde beim Vergleich der Standardzellzählung von 400 Zellen und einer neuen 5-Feld-Methode festgestellt, dass eine adäquate Reproduzierbarkeit der Mastzellzählung nur bei der 5-Feld-Methode mit einer hohen Zelldichte erreicht werden konnte (Fernandez et al. 2013). Die Reliabilität der Zählung neutrophiler Granulozyten war bei beiden Verfahren hoch (Fernandez et al. 2013). Daher wurde für eine adäquate Reproduzierbarkeit der Mastzellzählung und für eine verbesserte Beurteilung ungleichmäßig verteilter Proben für die BAL eine 5-Feld-Methode vorgeschlagen, wobei 5 Gesichtsfelder bei 500facher Vergrößerung und einer nötigen Zelldichte von >100 Zellen beurteilt werden sollen (Fernandez et al. 2013).

In einer Studie aus der Humanmedizin wurde die Reproduzierbarkeit der Differentialzellzählung in Bezug auf die Anzahl der gezählten Zellen untersucht (De Brauwer et al. 2002). Dazu wurden die Zellen zytozentrifugierter BAL-Ausstriche von zwei verblindeten Untersuchern ausgezählt und die Ergebnisse nach jeweils 100 gezählten Zellen dokumentiert (De Brauwer et al. 2002). Es wurden reproduzierbare Ergebnisse nach der Zählung von 300 Zellen für neutrophile Granulozyten, Alveolarmakrophagen und Lymphozyten erreicht, allerdings wurde eine verlässliche Zählung von Mastzellen erst ab 500 Zellen erreicht (De Brauwer et al. 2002). Diese und weitere Autoren beschreiben die Problematik der Differenzierung zwischen Lymphozyten und Makrophagen (Mayer et al. 1990). Zum Teil werden in der Humanmedizin auch eine Mindestanzahl an 600 Zellen für eine reproduzierbare Differenzialzellzählung angegeben (Stanzel 2013). Es wird generell empfohlen eine höhere Anzahl an Zellen zu zählen, um eine angemessene Aussage über das Vorkommen von Zellpopulationen zu machen, die nur in geringer Zahl vorkommen (Baughman 2007).

Bei einer humanen Studie zur Reliabilität (Übereinstimmung) zytologischer Ergebnisse der Differentialzellzählung der BAL wurde unter anderem der Einfluss verschiedener Untersucher überprüft (Warke et al. 2001). Die Reproduzierbarkeit zwischen verschiedenen Untersuchern (interrater) ergab exzellente Ergebnisse (>0,9 Lin's Konkordanz Koeffizient) für eosinophile Granulozyten, Makrophagen und neutrophile Granulozyten und deutlich schlechtere Ergebnisse der Reproduzierbarkeit für Lymphozyten (0,42) (Warke et al. 2001). Die Beurteilung der BAL-Ausstriche erfolgte durch zwei verblindete, trainierte Untersucher, die eine Zählung von 500 Zellen vornahmen (Warke et al. 2001). Auch bei einer Studie zu caniner BAL hatten Lymphozyten unter den Entzündungszellen die schlechteste Reproduzierbarkeit

und ergaben erst bei einer Zählung von 500 Zellen adäquate Ergebnisse (ICC >0,85) (De Lorenzi et al. 2009). Bei einer Zählung von 200 Zellen wurde bereits eine hohe Reproduzierbarkeit (ICC >0,9) für neutrophile Granulozyten, Alveolarmakrophagen und eosinophile Granulozyten erzielt (De Lorenzi et al. 2009). In der Studie von *De Lorenzi et al.* wurden zytozentrifugierte Präparate durch zwei verblindete Pathologen (ECVCP) beurteilt. Die Autoren wiesen darauf hin, bei einem Vergleich zytologischer Ergebnisse anderer Labore und eigenen Untersuchungen die gleiche Methode der Probenbearbeitung zu wählen sowie möglichst ein standardisiertes Protokoll zur Probenentnahme zu verwenden, da ansonsten Unterschiede in der Quantität bestimmter Zelltypen aufkommen können (De Lorenzi et al. 2009). Eine weitere Studie gibt eine bessere interindividuelle (zwischen verschiedenen Untersuchern) Übereinstimmung der Ergebnisse bei Zellpopulationen an, die in höherer Zahl vorkommen wie Makrophagen (Kappa Statistik 0,71), neutrophile Granulozyten (0,96) und Lymphozyten (0,64), im Vergleich zur weniger guten Übereinstimmung bei den Zellpopulationen, die in geringer Zahl vorkommen wie Mastzellen (0,58) und eosinophile Granulozyten (0,39) (Wasko et al. 2011).

Eine weitere Studie beschäftigte sich mit der Untersuchung zur intra- und interindividuellen Übereinstimmung der Mastzellzählung von drei Untersuchern in Bezug auf zwei verschiedene Färbemethoden (Toluidinblau und May-Grünwald-Giemsa) und einer Zählung von 500 Zellen (Hansen et al. 2019). Drei trainierte Untersucher mit einigen Jahren Erfahrung im Bereich der BAL-Zytologie zählten in dieser Studie die Zellen an exakt denselben mikroskopischen Koordinaten eines Objektträgers aus und gaben Prozentzahlen zu den Anteilen der einzelnen Zellarten an (Hansen et al. 2019). Ab einem ICC-Wert von 0,85 wurde in dieser Studie eine akzeptierbare Übereinstimmung der Ergebnisse erreicht. Eine nahezu akzeptierbare Übereinstimmung für die Mastzellzählung wurde bei der Toluidinblau Färbung (ICC 0,82) und eine geringere Übereinstimmung bei der MGG (ICC 0,76) zwischen den Untersuchern festgestellt (Hansen et al. 2019). Innerhalb der Untersucher wurden keine akzeptierbaren Übereinstimmungen der Ergebnisse zwischen den zwei Färbemethoden erzielt (Hansen et al. 2019). Die interindividuelle Übereinstimmung zwischen den drei Untersuchern war akzeptierbar für Makrophagen, Lymphozyten und neutrophile Granulozyten und unterhalb der akzeptierbaren Werte für eosinophile Granulozyten und Mastzellen. (Hansen et al. 2019).

In der Humanmedizin und auch beim Pferd wird geraten nur Entzündungszellen und keine Flimmer- oder Plattenepithelzellen in die Differenzialzellzählung mit einzubeziehen und Epithelzellen als Anteil der Gesamtzellzahl separat anzugeben, da unter anderem eine große Anzahl an Epithelzellen auf eine fehlerhafte BAL-Probe schließen lässt (Meyer et al. 2012; Richard et al. 2010; Stanzel 2013). Beim Pferd wurde ebenfalls festgestellt, dass ein Einbeziehen der Epithelzellen in die Differenzialzellzählung besonders im TBS eine unterschiedliche Einteilung der zytologischen Präparate zur Folge hatte (Allen et al. 2019).

Demnach wurden bei Einbeziehung der Epithelzellen 41% der Pferde mit >20% neutrophilen Granulozyten eingestuft, bei einer Differenzierung ohne Epithelzellen fielen 62% der Pferde mit >20% neutrophilen Granulozyten auf (Allen et al. 2019). Insgesamt war der Anteil an Epithelzellen im TBS mit 37% deutlich höher als in der BAL mit nur 6% (Allen et al. 2019). Dementsprechend fielen die Missklassifizierungen der BAL-Proben weniger stark aus (Allen et al. 2019).

2.7.4 Zytologische Befunde in TBS- und BAL-Ausstrichen

Die zytologische Untersuchung von TBS und BAL kann zusätzlich zur klinischen und endoskopischen Untersuchung wichtige Informationen über den Krankheitszustand eines Pferdes liefern (Freeman et al. 1993). Zum Teil kann die zytologische Untersuchung sensitiver als die klinische Untersuchung zur Detektion respiratorischer Erkrankungen sein (Freeman et al. 1993). Wenn allerdings ein nicht betroffener Lungenbereich bei der BAL beprobt wird, kann es sein, dass erwartete Befunde in der Zytologie nicht vorkommen, daher wird empfohlen bei einer Atemwegsuntersuchung beide Probenarten (TBS und BAL) des Pferdes zu entnehmen (Freeman et al. 1993).

Bei der zytologischen Untersuchung werden unter anderem die Quantität und Qualität der Entzündungszellen beurteilt (Hoffman et al. 2003; Zinkl 2002). Dabei handelt es sich um Alveolarmakrophagen, Lymphozyten, neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten und Mastzellen (Hoffman et al. 2003; Zinkl 2002). Generell sollte eine ausreichende Anzahl an Makrophagen vorliegen, da andernfalls eine unzureichende Probennahme erfolgt sein kann (Bain 1997).

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl hat einen fraglichen klinischen Nutzen, da es zu variablen Werten durch unterschiedliche Mengen an instillierter Flüssigkeit, durch Vorkommen von Mukus und durch Verzögerungen bei der Probenbearbeitung kommen kann (Hoffman et al. 2003; Cian et al. 2015). Des Weiteren werden variable und geringe Flüssigkeitsmengen bei Pferden mit SEA zurückgewonnen, weswegen die Bestimmung der Gesamtzellzahl weniger bedeutend als die Differenzierung der einzelnen Zellpopulation ist (Jean et al. 2011; McGorum und Dixon 1994). Ebenso kann es bei einer Zählung mittels Hämozytometer zu einer inakkuraten Messung kommen (Lapointe et al. 1994).

Referenzwerte der Differenzialzellzählung gesunder Kontrollpferde von TBS und BAL aus verschiedenen Studien sind in den Tabellen 1 und 2 zusammengestellt. In diese Tabellen wurden ebenfalls Informationen zu den Referenzwerten der in dieser Arbeit beteiligten Labore integriert.

Tabelle 1: Referenzwerte der Differentialzellzählung des TBS gesunder Pferde aus Kontrollgruppen sowie vorgeschlagene physiologische Referenzwerte, US: Untersucher.

Autoren	Makrophagen (%)	neutrophile Granulozyten (%)	Lymphozyten (%)	eosinophile Granulozyten (%)	Mastzellen (%)
(Mair et al., 1987) Endoskopie	65.0 ± 13.7	6.4 ± 5.5	7.4 ± 3.8	1.2 ± 1.4	0.2 ± 0.4
(Christley et al., 1999)	74.2 ± 11.1	10 ± 10.8	13.0 ± 3.6	1.9 ± 1.2	
(May & Gehlen, 2009)	30-35	10-30	25-30	0	0,5
Labor 2 (Studie)	40-90	<20	<30	<1	<1
Klinik für Pferde US B (Studie)	30-35	10-30	25-30	0	0,5
Klinik für Pferde US A (Studie)	50-60	10-30	10-15	0-2	selten
Boehringer (Broschüre)	30-45	10-30	25-35	0	0-1
(Azevedo et al., 2014) Mittelwerte	18,27 ± 8,24 (aktivierte Zellen)	25 ± 9,6	4,25 ± 1,0	0,25 ± 0,16	
(Cian et al., 2015)	79,6 ± 8,2	9,3 ± 4,9	9,3 ± 5,8	0	0,2 ± 0,6

Tabelle 2: Referenzwerte der Differentialzellzählung der BAL gesunder Pferde aus Kontrollgruppen sowie vorgeschlagene physiologische Referenzwerte, US: Untersucher.

Autoren	Makrophagen (%)	neutrophile Granulozyten (%)	Lymphozyten (%)	Mastzellen (%)	eosinophile Granulozyten (%)
(Couetil & Denicola, 1999)	68,8 ± 8,8	3,8 ± 5,5	22,9 ± 7,4	1,5 ± 0,3	2,0 ± 1,0
(Holcombe et al. 2001) (Weide)	41 ± 10,8	3,6 ± 3,5	42,6 ± 11,5	6,6 ± 5,1	0,7 ± 1,7
(S. J. HOLCOMBE 2001) (Stall)	41,4 ± 9,7	10,3 ± 8,1	37,0 ± 9,8	4,4 ± 3,9	1,2 ± 2,2
(Hare & Viel, 1998)	67,7	0,4	31,5	1	0,3
(May & Gehlen, 2009)	45-70	0-8	30-50	0-5	0-1
(Barton et al., 2007)	65	3	30	0,5	0,1
(Hoffman A. et al. 2003)	60	<5	35	<2	<0,5
(Lapointe et al., 1994)	26 ± 6	2,2 ± 1,9	69 ± 3	0,2 ± 0,3	0 ± 0
(McKane et al., 1993a)	59 ± 9,7	8,8 ± 6,4	31,3 ± 9,3		0,5 ± 3,1
(Couetil et al., 2001)	57,1 ± 10,3	6,8 ± 2,7	31,4 ± 13,0	1,5 ± 0,8	0,3 ± 0,5
(Clark et al., 1995b)	56 ± 13,0	5,9 ± 4,6	36,7 ± 14,8	0,8 ± 1,8	0,5 ± 0,9
(Richard et al., 2009)	61 ± 16,9	5,1 ± 2,0	20,4 ± 9,9	0,6 ± 0,5	0,3 ± 0,5
(Hoffman, 2008)	50-70	<5	30-50	<2	<0,1
(Couetil et al., 2016)		<5%		<1%	<2%
(Fogarty & Buckley, 1991)	65 ± 6	7 ± 3,3	28 ± 6	0,2 ± 0,6	0 ± 0
Labor 2 (Studie)	50-70	0-5	30-50	0-5	0-1
Klinik für Pferde – US B	45-70	0-8	25-30	0-5	0-1
Klinik für Pferde – US A	60-70	0-8	10-35	0-2	0-2

Alveolarmakrophagen stellen den Hauptzelltyp im TBS dar, sind aber bei einem gesunden Pferd dennoch in geringer Zahl anzutreffen (Diekmann und Deegen 1990), Lymphozyten kommen geringgradig vor (Hoffman et al. 2003; Nuytten et al. 1983). Das Vorkommen geringer Zellzahlen morphologisch unauffälliger neutrophiler Granulozyten gilt als physiologisch (Nuytten et al. 1983). Mastzellen kommen im TBS gesunder Pferde im Vergleich zur BAL nur selten vor, auch eosinophile Granulozyten sind nur in geringen Zahlen im TBS anzutreffen (Hoffman et al. 2003). Für die Zytologie des TBS stehen keine universell akzeptierten Referenzintervalle für die Differentialzellzählung zur Verfügung (Cian et al. 2015). In der BAL kommen bei gesunden Pferden <5% neutrophile Granulozyten vor, auch Mastzellen und Eosinophile sind mit <2% und <1% selten anzutreffen (Couetil et al. 2016).

Das TBS eines gesunden Pferdes ist zell- und schleimarm und enthält unter anderem zilierte, hochprismatische Flimmerepithelien (Bain 1997; Cian et al. 2015; Diekmann Deegen 1990). Flimmerepithelien sind anhand der apikalen Platte mit Zilienbüscheln, dem basalen Kern und ihrer säulenförmigen Gestalt zu erkennen (Hewson and Viel 2002; Zinkl 2002). Die Zilien gehen allerdings oft im Rahmen der Probenbearbeitung verloren, sodass nur noch die Terminalplatte übrigbleibt (Diekmann und Deegen 1990). Bei einer viralen Infektion kommt es zu einer erhöhten Zahl an Epithelzellen in Zusammenhang mit einer Epithelschädigung, die mit einem Verlust an Zilienplatten (Ziliozytosphthoria) und Pyknose der Kerne einhergeht (Diekmann und Deegen 1990; Freeman et al. 1993; Hewson und Viel 2002). Bei equinem Asthma in Exazerbation kann es in der BAL ebenfalls zum Verlust von Zilien und zytoplasmatischen Schaden kommen, allerdings kommt es nicht zu einer Separation der gesamten Zilienplatte (Hewson und Viel 2002). Das Vorkommen von Plattenepithelien lässt auf eine Kontamination durch den Oropharynx schließen (Couetil und Thompson 2020a). Sie stellen sich als große, abgeplattete moderat basophil z.T. azidophil gefärbte Zellen dar (Zinkl 2002). Die Zellkerne sind oft pyknotisch oder fragmentiert und Bakterien können an der Oberfläche der Zellen anhaften (Zinkl 2002). Als Creolakörperchen werden im Verband abgestoßene Epithelien bezeichnet, welche auf degenerative Schleimhautprozesse hinweisen und nach einem exzessiven Husten vorkommen können (Barton et al. 2007; Deconto 1985). Darüber hinaus können eine Basalzellhyperplasie (normal nicht im TBS zu finden), eine Becherzellhyperplasie und eine Plattenepithelmetaplasie hinweisend auf eine chronische Erkrankungsdauer sein (Diekmann und Deegen 1990). Das Vorkommen von mukusproduzierenden Becherzellen ist bei gesunden Pferden eher ungewöhnlich (Barton et al. 2007; Cian et al. 2015; Mazan 2018; Whitwell und Greet, 1984). Sie variieren in Größe und Form abhängig von der Menge an violetten-dunkelblauen Mukusgranula und geben Hinweise auf eine Hyper- oder Dyskrinie (Barton et al. 2007; Cian et al. 2015; Mazan 2018; Whitwell und Greet, 1984). Ihre Granula sind größer als die von Mastzellen und Eosinophilen, wodurch eine Unterscheidung der Zellen möglich ist (Mazan 2018). Becherzellen kommen als

mukusproduzierende Zellen in der Trachea und den Bronchien vor, allerdings nicht in den terminalen Bronchiolen, wo sie durch Clarazellen ersetzt werden (Deconto 1985; Derksen und Robinson 2002; Kaup et al. 1990a). Clarazellen können durch charakteristische basophile intrazytoplasmatischen Einschlüsse erkannt werden (McGorum und Dixon 1994).

Alveolarmakrophagen sind die im TBS und der BAL am häufigsten vorkommende Zellart (Michelotto et al. 2013). Sie sind mit reichlich Zytoplasma und einem runden oder ovalen Kern ausgestattet (Hewson and Viel 2002; Mazan 2018; Whitwell und Greet 1984). Zellen in Phagozytose und multinukleäre Zellen stellen aktivierten Formen der Makrophagen dar (May und Gehlen 2009; Mazan 2018). Das phagozytierte Material lässt aber nicht zwangsläufig auf die Ursache der Erkrankung schließen und auch bei gesunden Pferden kann es zur Phagozytose von Debris kommen (Diekmann und Deegen 1990; Mazan 2018). Bei einer Clearancestörung unter anderem bei hochgradigem Asthma kann es ebenfalls zu phagozytierten Pilzhypen und -sporen sowie Bakterien kommen (May und Gehlen 2009). Bei der Phagozytose von Erythrozyten kommt es nach 24-72 Stunden zur Bildung von Hämosiderin, was in Form von gelben, grünen oder braunen Pigmenten in den Vakuolen im Zytoplasma von Makrophagen zu finden ist (Couetil und Thompson 2020a; Hewson und Viel 2002). Hämosiderophagen werden regelmäßig bei Rennpferden im Training beobachtet und sind noch nach mehr als 3 Wochen zu diagnostizieren (Barton et al. 2007; McKane et al. 1993). Perl's Prussian Blau ist die Färbung der Wahl zur Darstellung von Hämosiderin (Hewson und Viel 2002).

Multinukleäre Zellen (auch Riesenzellen) entstehen durch die Fusion aktivierter Makrophagen und sind Zeichen einer chronischen Entzündung, die durch eine gestörte Clearance und eine bronchiale Obstruktion charakterisiert ist (Bain 1997; Basano et al. 2022; Brooks et al. 2019; Deconto 1985). Beim Vorkommen großer Partikel von Fremdmaterial entstehen Riesenzellen, da eine mononukleäre Zelle dafür nicht ausreichend groß ist (Deconto 1985). Ein mehrkerniger Alveolarmakrophage ist in Abbildung 1 dargestellt. Eine erhöhte Anzahl konnte bei SEA festgestellt werden, wobei auch ein Zusammenhang der Entstehung mit einer staubhaltigen Umgebung vermutet wird (Basano et al. 2022). Bei einer interstitiellen Lungenerkrankung kommt es zu einer Erhöhung der Zahl an Alveolarmakrophagen (Diekmann und Deegen 1990). Makrophagen mit fein vakuolisiertem Zytoplasma kommen im normalen Zellbild vor, wobei große vakuolisierte Makrophagen meist im Zusammenhang mit einer Lungenerkrankung stehen (Whitwell und Greet 1984).

Durch die Obstruktion der Bronchien, Akkumulation von Sekret und durch ein Ödem der Mukosa kann es zu einem verlängerten Aufenthalt der Makrophagen in kleinen Bronchiolen und Alveolen kommen (Deconto 1985). Dadurch kommt es zur Phagozytose von *Surfactant*, was ihr schaumiges Aussehen hervorruft (Deconto 1985). In Abbildung 2 ist ein schaumiger Alveolarmakrophage dargestellt. Nach bronchodilatatorischer Therapie kann durch eine

gesteigerte bronchioläre Clearance das Vorkommen einer vermehrten Anzahl an schaumigen Makrophagen hinweisend auf eine Atemwegsobstruktion sein (Deconto 1985).

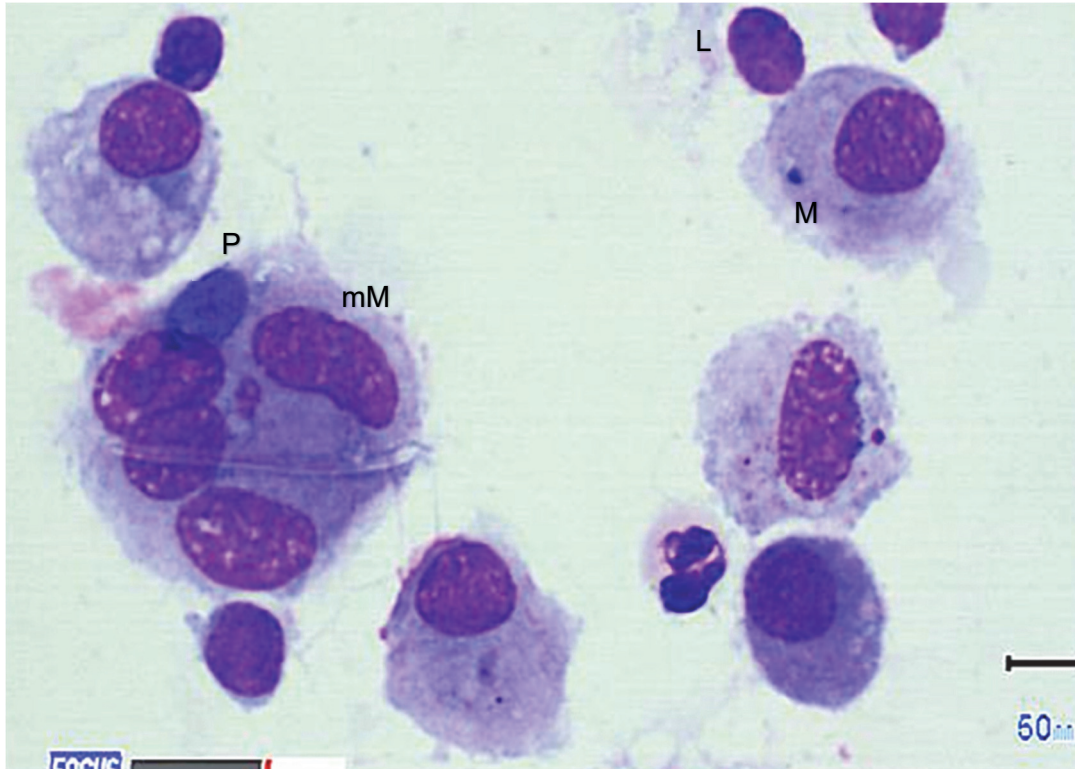


Abbildung 1: Zytologiebild BAL: Phagozytose einer Polle (P) durch einen mehrkernigen Makrophagen (mM), Alveolarmakrophage (M), Lymphozyt (L), Diff-Quik-Färbung, 1000er-Vergrößerung.

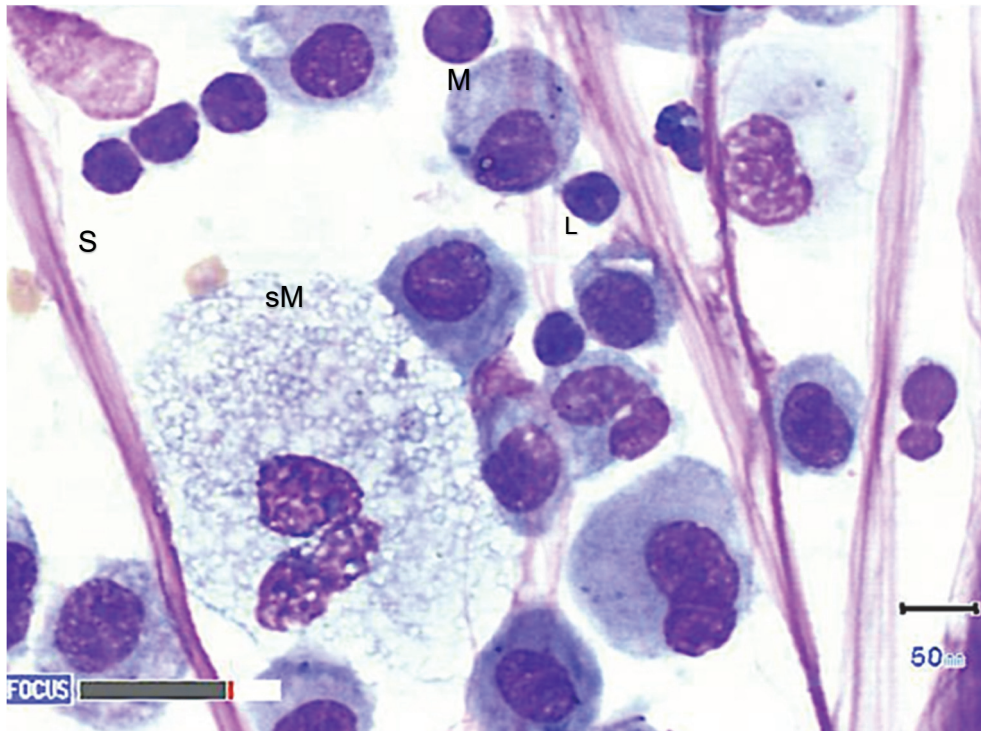


Abbildung 2: Zytologiebild BAL: Mukusstränge (S), schaumiger Alveolarmakrophage (sM), Lymphozyt (L), Alveolarmakrophage (M), Diff-Quik-Färbung, 1000er-Vergrößerung.

Neutrophile Granulozyten kommen in höheren Anteilen im TBS als in der BAL vor (Barton et al. 2007; Mazan 2018). Physiologische Grenzwerte liegen im TBS unter 20-30%, bei der BAL unter 5-10% (s. Tab. 1 und 2). Erkennbar sind die Zellen an ihrem mehrfach gelappten Kern sowie dem pinken Zytoplasma (McGorum und Dixon 1994). Ältere neutrophile Granulozyten sind an einer Hypersegmentierung des Kerns zu erkennen (Couetil und Thompson 2020a). Die Morphologie der neutrophilen Granulozyten ist bei vermehrtem Vorkommen zur Differenzierung eines septischen Prozesses von Bedeutung (Bain 1997; Hewson und Viel 2002). Bei chronischen Erkrankungen kann es zu einer großen Anzahl an nicht degenerierten Neutrophilen kommen (Bain 1997). Ein Zytologiebild mit hochgradig neutrophilen Granulozyten ist in Abbildung 3 dargestellt. Bei einer bakteriellen Pneumonie gibt es Anzeichen einer Zelldegeneration in Form von Karyolyse (Zellschwellung, Verlust der Segmentation, verminderte Zellfärbung, Lysis der Zelle), Kernpyknose (Verdichtung Chromatin, Schrumpfung der Kerne) und Karyorrhexis (Fragmentierung Zellkern) (Hodgson und Hodgson 2002, Zinkl 2002). Eine verzögerte Probenbearbeitung führt ebenfalls zu einer degenerierten Erscheinung der neutrophilen Granulozyten (Cian et al. 2015; Mazan 2018, Zinkl 2002). Zum Teil sind intra- und extrazelluläre Bakterien zu finden, wobei eine vorangegangene antibiotische Therapie die Zahl der Bakterien verändern kann (Bain 1997). Extrazelluläre Bakterien geben ebenfalls Hinweise auf eine Umweltkontamination (Cian et al.

2015). Darüber hinaus müssen immer die klinischen Symptome beachtet werden, da eine Zytologie allein nicht für die Diagnosestellung ausreicht (Cian et al. 2015). Da die Lunge allerdings einen Ort der Beseitigung neutrophiler Granulozyten darstellt, ist auch das Vorkommen einiger degenerierter (karyolytische) neutrophiler Granulozyten physiologisch (Bain 1997). Ebenso kann es bei der Störung der mukoziliären Clearance zu vermehrten hypersegmentierten und degenerierten neutrophilen Granulozyten kommen (Barton und Gehlen 2022; Deconto 1985).

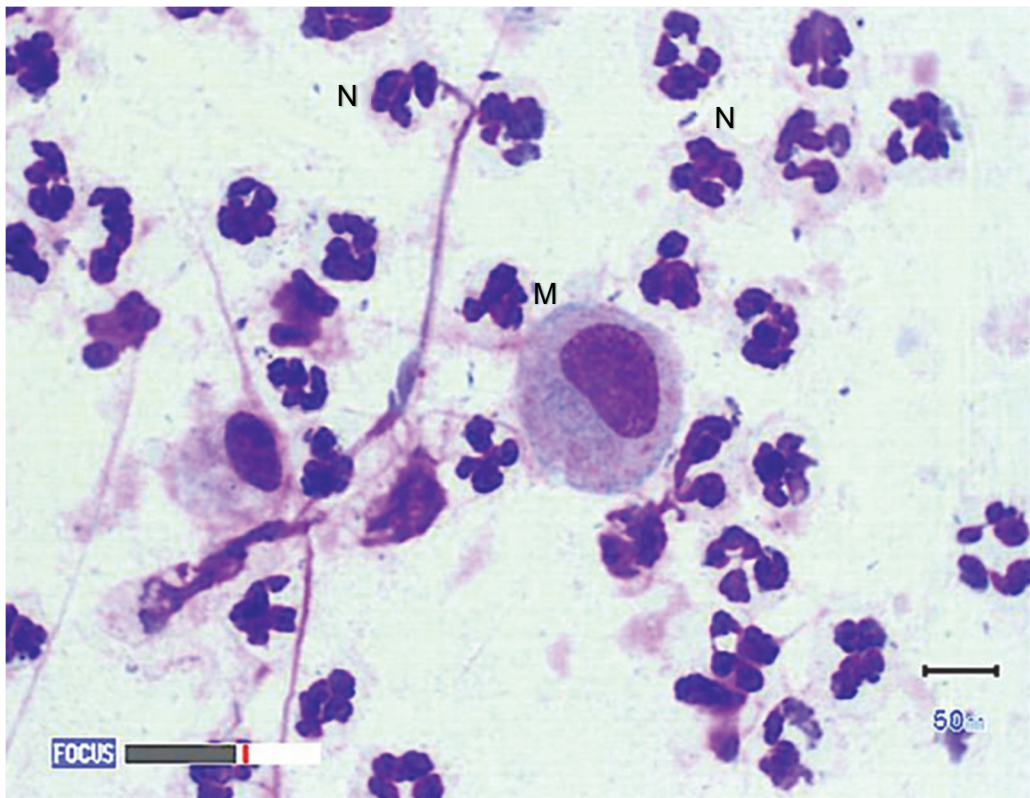


Abbildung 3: Zytologiebild BAL: hochgradig neutrophile Granulozyten (N), einzelner Makrophage (M), Diff-Quik-Färbung, 1000er-Vergrößerung.

Lymphozyten sind überwiegend kleine Zellen mit wenig Zytoplasma und einer dichten dunkelblauen Färbung des Kerns (Barton et al. 2007; Hewson und Viel 2002; McGorum und Dixon 1994). Es kommen kleine und größere Lymphozyten vor, welche zum Teil nicht leicht von Zellen mit ähnlichen morphologischen Merkmalen abzugrenzen sind wie z.B. kleine Makrophagen oder Epithelzellen (Hewson and Viel 2002; Hoffman et al. 2003; Whitwell und Greet 1984). Generell kommen im TBS weniger Lymphozyten vor als in der BAL (Hoffman et al. 2003). In der BAL sind die Referenzintervalle für Lymphozyten bei gesunden Pferden groß, was unter anderem durch eine unterschiedliche Probenbearbeitung, Unterschiede in der

Haltung, dem Alter oder einer übersehenen subklinischen Atemwegsentzündung begründet werden kann (Hewson und Viel 2002).

Eosinophile Granulozyten sind anhand ihrer rosafarbenen Granula sehr gut zu erkennen, der Kern kann zweilappig oder doppelt sein (s. Abb. 4) (Whitwell und Greet 1984). Zerfallsprodukte der Zellen, die bei der Degeneration entstehen, werden als Charcot-Leyden-Kristalle bezeichnet (Barton et al. 2007; Mazan 2018). Ihr Vorkommen wird bei allergischer Bronchitis beobachtet (May und Gehlen 2009). Ein vermehrtes Vorkommen der eosinophilen Granulozyten kann auf eine parasitäre Lungenerkrankung hinweisen oder wie bereits erwähnt bei einem Subtyp des MEA vorkommen (Diekmann und Deegen 1990; Whitwell und Greet 1984).

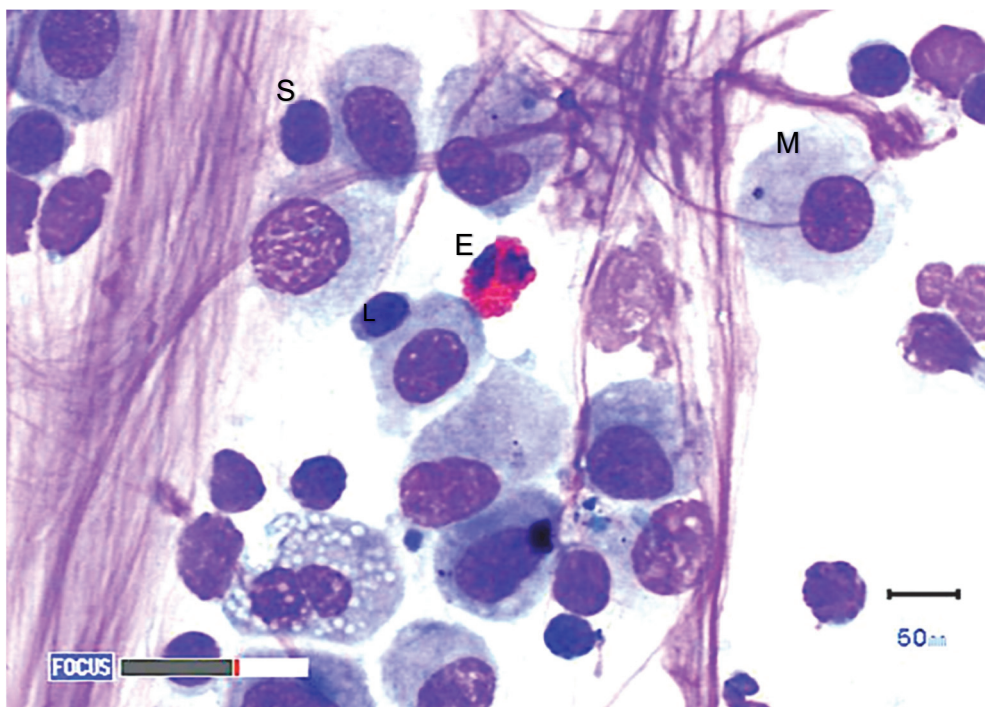


Abbildung 4: Zytologiebild TBS: eosinophiler Granulozyt (E), außerdem Mukusstränge (S), Alveolarmakrophagen (M) und Lymphozyten (L), Diff-Quik-Färbung, 1000er-Vergrößerung.

Mastzellen sind ähnlich groß wie Alveolarmakrophagen und haben einen tief basophil gefärbten, zentral liegenden Kern (Barton et al. 2007; Mazan 2018). In ihrem Zytoplasma enthalten sie multiple metachromatische (pink-violette) Granula, wobei sie unterschiedliche Grade der Degranulation annehmen können, abhängig von einer vorliegenden Hyperreaktivitätsreaktion (Hewson und Viel 2002; McGorum und Dixon 1994). Mastzellen werden überwiegend in der BAL und nicht oder kaum im TBS gefunden (Barton et al. 2007; Couetil und Thompson 2020a).

Des Weiteren können inhalierte Fremdbestandteile wie Schimmelpilze, Rußpartikel oder Pflanzenmaterial wie Pollen vorkommen, die Hinweise auf eine staubbelastete Atemluft oder auch eine gestörte Clearance geben können (Couetil und Thompson 2020a; Deconto 1985; May und Gehlen 2009; Schwarz und Kühn 2021). Inhalierte Elemente können intra- oder extrazellulär zu finden sein (Cian et al. 2015; Mazan 2018). Kontaminanten sind meist extrazellulär zu finden, intrazelluläre Keime oder Elemente können auf eine wahre Infektion hindeuten (Bain 1997). Fungale Elemente können durch eine Kontamination im Ausstrich enthalten sein, sie können aber auch primär pathogene Pilze sein wie *Cryptococcus spp.*, *Blastomyces spp.*, *Histoplasma spp.*, *Coccidioides spp.* (Cian et al. 2015). Häufig vorkommende Schimmelpilze sind *Alternaria spp.* (mit einem breiten und einem dünnen Ende) und *Cladosporium spp.* (klein und eiförmig) (Mazan 2018).

Bakterien können ebenfalls entweder eine Kontamination aus dem Oropharynx oder der Umwelt sein oder pathogene Keime darstellen (Zinkl 2002). Das Vorkommen dieser weiteren Elemente wird mit den klinischen Symptomen in Zusammenhang gebracht, um die Relevanz der Bakterien oder Pilze zu beurteilen (Zinkl 2002). Bei dem Vorkommen von *Simonsiella spp.* kann auf eine Verunreinigung der Probe geschlossen werden, da es eine nasopharyngeale Kommensale darstellt (Cian et al. 2015). Pathogene Bakterien sind unter anderem *Streptococcus equi zooepidemicus*, *Actinobacillus equuli equuli*, *Actinobacillus equuli haemolyticus*, *Pasteurella spp.*, *Mycoplasma spp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* und *Streptococcus equi equi* (Richard et al. 2010). Kontaminanten stellen *koagulase-negative Staphylokokken*, *alpha-hämolytische Streptokokken*, *Pseudomonas spp.*, *Staphylokokkus aureus*, *Bacillus spp.* und *Proteus spp.* dar (Richard et al. 2010).

Das Vorkommen von Mukus sollte in Zusammenhang mit den endoskopischen Befunden beurteilt werden (May und Gehlen 2009). Im TBS stellen schleimhaltige Substanzen, dünne bis mäßig dicke Stränge aus dunkelviolettem Material, einen häufigen Befund dar (Couetil und Thompson 2020a). Häufig im Mukus enthalten sind Zellklumpen oder nicht zelluläre Elemente, zum Teil in so einem Ausmaß, dass es bei einer ausschließlichen Beurteilung mukusfreier Anteile zu einer Unterschätzung von neutrophilen Entzündungen in der BAL kommen kann (Mazan 2018). Curschmannspiralen sind dunkle Spiralen aus eingedicktem Mukusauswurf aus den Bronchioli, zu finden bei chronischen Atemwegsentzündungen (Barton et al. 2007; Couetil und Thompson 2020a; Diekmann und Deegen 1990; Mazan 2018; Whitwell und Greet 1984). Eine Curschmannspirale und ein Mukusstrang sind in den Abbildungen 5 bzw. 6 dargestellt. Sie sind vor allem bei Pferden mit exzessiver und verlängerter Mukusproduktion vorhanden und weisen auf Phasen von Sekretstase und Sekretmobilisation hin (Diekmann und Deegen 1990; Zinkl 2002). Sie führen zu einer temporären Obstruktion und einem Kollaps des mukoziliären Transportes in den terminalen Atemwegen (Deconto 1985).

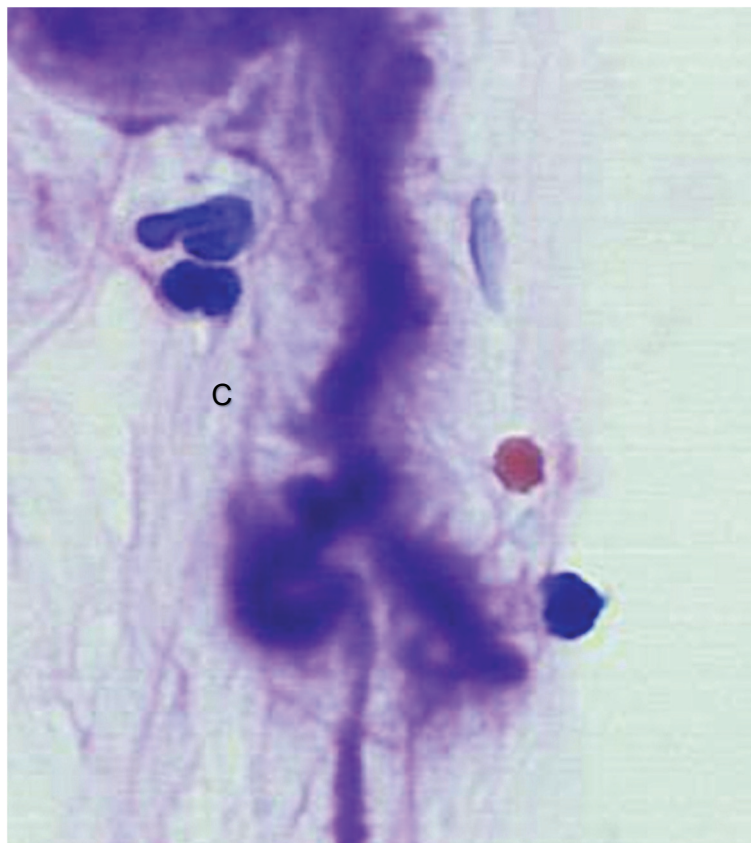


Abbildung 5: Zytologiebild TBS: Curschmannspirale (C), Diff-Quik-Färbung, 1000er-Vergrößerung.

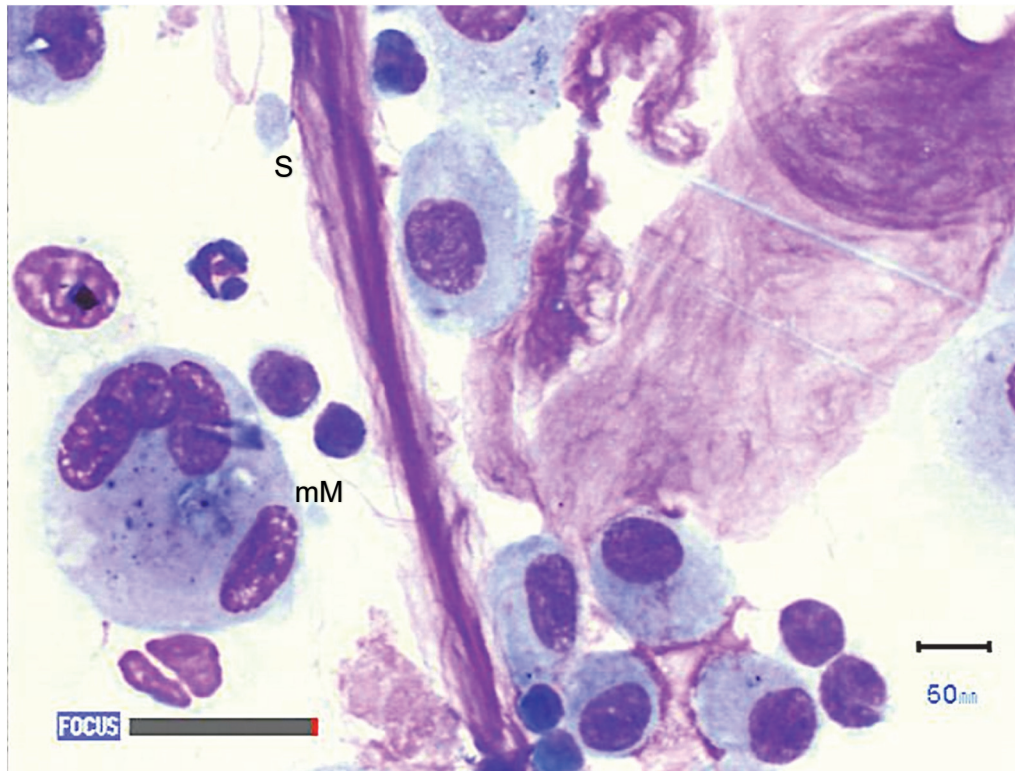


Abbildung 6: Zytologiebild BAL: Mukusstrang (S), mehrkerniger Makrophage (mM), Diff-Quik-Färbung, 1000er-Vergrößerung.

Erythrozyten sind meistens durch Mikrotraumata des Epithels bei der Probenentnahme von TBS oder BAL zu finden oder können Hinweise auf eine kürzlich stattgefundenen Lungenblutung (EIPH) geben (McGorum und Dixon 1994; Zinkl 2002). Im Verlauf kommt es zur Phagozytose der Erythrozyten durch Alveolarmakrophagen und zur Entstehung der Hämosiderophagen (s.o.).

2.7.5 Einflüsse auf die zytologischen Ergebnisse - Probenentnahme und weitere Einflüsse

Die zytologischen Ergebnisse des TBS und der BAL variieren nicht nur bei verschiedenen Krankheitszuständen, sondern auch durch unterschiedliche Protokolle der Probenentnahme, Probenbearbeitung sowie durch weitere Einflüsse wie Alter, Haltung, Temperatur, vorherige Belastung, wiederholte Probenentnahme oder einen längeren Transport (Literatur s.u.). So kann es durch verschiedene Einflüsse zu unterschiedlichen zytologischen Ergebnissen eines Pferdes kommen, was unter anderem für Verlaufsuntersuchungen wichtig ist.

Die Probenentnahme der BAL erfolgt im Normalfall wie bereits beschrieben entweder endoskopisch oder blind von einer Lokalisation innerhalb der Lunge. Unterschiedliche Ergebnisse wurden bei Vergleichen zur Probenentnahme aus der rechten und linken Lunge

erzielt (Depecker et al. 2014). In einer Studie kam er zu einer signifikant höheren Prozentzahl an Neutrophilen und Hämosiderophagen in der rechten Lunge im Vergleich zur linken Lunge, bei der Mastzellzahl gab es keine signifikanten Unterschiede (Depecker et al. 2014). Die BAL wurde hier mit 250ml steriler Kochsalzlösung in beiden Lungenhälften durchgeführt (Depecker et al. 2014). Weitere Untersuchungen kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen wobei einmal signifikant höheren Mastzellzahlen in der linken Lungenhälfte und einmal signifikant höhere Werte in der rechten Lungenhälfte festgestellt wurden (Jean et al. 2011; Sweeney et al. 1992). Hier wurde in einer Studie geschlussfolgert, dass die zytologischen Ergebnisse zwischen rechter und linker Lunge bei gesunden Pferden und Pferden mit SEA annähernd gleich sind und daher die blinde Probenentnahme mit einer BAL Sonde von einer Stelle in der Lunge angemessen ist (Jean et al. 2011). Bei einem Vergleich gepoolter Proben aus beiden Lungenhälften und individueller Proben aus beiden Lungenhälften wurde eine gute Übereinstimmung beider Proben für neutrophile Granulozyten festgestellt, allerdings gab es nur moderate Ergebnisse bei Mastzellen und eosinophilen Granulozyten (Hermange et al. 2019). Bei der endgültigen Diagnosestellung von gesund, mildem bis moderaten und schweren equinem Asthma kam es zu einer guten Übereinstimmung der Diagnosestellung von gepoolten Proben aus beiden Lungenhälften und kombinierten individuellen Proben aus beiden Lungen, sodass die Zytologie einer gepoolten Probe beider Lungenhälften als repräsentativ für beide Lungenseiten erachtet wurde (Hermange et al. 2019). In dieser Studie war überwiegend der neutrophile Subtyp von MEA vertreten und der Einfluss von Mastzellen und eosinophilen Granulozyten auf die Diagnosestellung wurde nur als begrenzt angesehen (Hermange et al. 2019). Wurde allerdings nur die Zytologie einer Lungenseite beachtet, kam es bei 6 von 51 Pferde zu einer anderen zytologischen Diagnose (Hermange et al. 2019). Hier wurden Pferde mit MEA falsch als gesund eingestuft (Hermange et al. 2019). Diese falsche Diagnosestellung erfolgte bei verschiedenen Grenzwerten für neutrophile Granulozyten, Mastzellen und eosinophile Granulozyten. Dabei wurden strengere Grenzwerte von >5% neutrophilen Granulozyten, >1% eosinophilen Granulozyten und >2% Mastzellen und weniger strenge Grenzwerte von >10% für Neutrophile und >5% für Mastzellen und Eosinophile, ab denen MEA zytologisch diagnostiziert wurde, herangezogen (Hermange et al. 2019). In der Studie von *Depecker et al.* kam es bei 37% der Pferde zu einer anderen Diagnose, wenn nur eine Lungenseite beprobt wurde. Durch eine Anhebung der Grenzwerte für neutrophile Granulozyten auf >10%, bei Mastzellen und eosinophile Granulozyten auf >5%, kam es zu einer insgesamt besseren Übereinstimmung zwischen beiden Lungenseiten, sodass weniger Pferde als gesund missklassifiziert wurden, wenn nur die rechte oder linke Lunge beprobt wurde (17,4% und 12,8%) (Depecker et al. 2014). Daraus wurde geschlussfolgert, dass die Probenentnahme einer Lungenseite nicht immer repräsentativ für die andere Seite ist und zur Diagnosestellung eines gesunden Pferdes beide Lungenseiten beprobt werden sollten

(Depecker et al. 2014). Andere Untersuchungen ergaben keine regionalen Unterschiede in der Differenzialzellzählung zwischen rechter und linker Lunge, sodass angenommen wurde, dass eine Probe aus einem Lungenbereich repräsentativ für die Zytologie der gesamten Lunge ist (McGorum et al. 1993a).

Ebenso hat das Volumen der eingegebenen Lavageflüssigkeit bei der BAL Einfluss auf die Diagnosestellung, da innerhalb einer Volumenmenge von 250-500ml Unterschiede in der Zytologie auftreten (Orard et al. 2016). Ein Vergleich der Eingabe von 250 und 500ml Flüssigkeit ergab signifikant weniger neutrophile Granulozyten und ein höheres zurückgewonnenes Flüssigkeitsvolumen bei der Instillation von 500ml (Orard et al. 2016). Bei diesem Vergleich kam es bei 32% der Pferde zu Unterschieden in der Diagnose (Orard et al. 2016). Eine höhere Prozentzahl an neutrophilen Granulozyten und eine geringere Zahl an Mastzellen werden bei einem kleinen Volumen (50ml) im Vergleich zu größeren Volumen (350ml) erzielt (Sweeney et al. 1992). Es wurden ebenfalls Unterschiede in aufgeteilten oder gepoolten Aliquoten bei der Eingabe der Lavageflüssigkeit untersucht (Sweeney et al. 1992). Bei der Aufteilung der Eingabe von 300ml in 3 einzelne Spülungen und bei der Eingabe der gesamten Menge an Lavageflüssigkeit konnten keine Unterschiede innerhalb der Zellpopulationen in der BAL festgestellt werden, abgesehen von einer höheren Rückgewinnungsrate und höheren Zahlen an Makrophagen bei der Eingabe der gesamten Flüssigkeit (Sweeney et al. 1992). Weitere Untersuchungen zeigten, dass es im ersten Aliquot eine höhere Anzahl an Mastzellen als in den darauffolgenden Aliquoten gab (Pickles et al. 2002a). In dieser Studie erfolgte die Eingabe von 300ml Flüssigkeit, wobei die ersten aspirierten 20ml das erste Aliquot darstellten und die anderen Aliquote im Verlauf der Aspiration gewonnen wurden. Diese Unterschiede wurden allerdings nicht als diagnostisch signifikant erachtet, sodass alle Aliquote, auch gepoolte Aliquote, als zytologisch aussagekräftig für das beprobte Lungensegment gelten (Pickles et al. 2002a). Darüber hinaus wurden in einer weiteren Studie zwei Mal 250ml Flüssigkeit instilliert und aspiriert und verglichen (Jean et al. 2011). Im ersten Aliquot wurden höhere Prozentzahlen an neutrophilen Granulozyten bei gesunden Pferden (1. Aliquot: 12,1% ± 6,9; 2. Aliquot: 4,9% ± 6,9) und Pferden mit schwerem equinem Asthma (1. Aliquot: 72,2% ± 6,9; 2. Aliquot: 65,0% ± 6,9) festgestellt (Jean et al. 2011). Geringere Werte an Makrophagen fanden sich bei beiden Gruppen im ersten Aliquot (Jean et al. 2011). Es wird angenommen, dass das zweite Aliquot für eine zytologische Evaluation der bronchoalveolären Region aussagekräftiger ist und das erste Aliquot diese Region nicht vollständig erreicht (Jean et al. 2011). Eine Bronchoalveolarlavage soll geringere Prozentzahlen an Epithelzellen und neutrophilen Granulozyten und höhere Prozentzahlen an Makrophagen, Lymphozyten, eosinophilen Granulozyten und Mastzellen enthalten als eine Bronchiallavage (Mair et al. 1987). Einflüsse der Zentrifugation und der Färbung auf die Zytologie wurden bereits angesprochen.

Der Einfluss wiederholter Probennahme auf die Zytologie wurde ebenfalls in Studien untersucht. Ein lokaler neutrophiler Einstrom wurde 48 Stunden nach der BAL festgestellt, wobei die Erhöhung der neutrophilen Granulozyten im Rahmen der Referenzwerte für gesunde Pferde lag (Sweeney et al. 1994). In einer weiteren Studie kam es zu einer signifikanten Erhöhung der Neutrophilen 2,5 Stunden nach wiederholter Probennahme im TBS (Tee et al. 2012). In dieser Studie kam es bei wiederholter Probenentnahme der BAL nach ≥ 24 Stunden zu keinen signifikanten Veränderungen der Zellpopulationen (Tee et al. 2012). Kontinuierliches Training führte bei Rennpferden bei einer Probennahme über fünf Monate hinweg zu keinen Anzeichen einer Entzündungsreaktion (Clark et al. 1995a). Die Probennahme 1-2 Stunden nach anstrengender Belastung von Pferden mit Leistungsinsuffizienz ergab eine signifikante Erhöhung der Prozentzahl an neutrophilen Granulozyten im Vergleich zu den Werten vor der Belastung (Malikides et al. 2007). Vor der Belastung lagen die neutrophilen Granulozyten durchschnittlich bei 18%, nach der Belastung bei 34%, wobei der Anstieg der Neutrophilen besonders bei Pferden, die vor der Belastung $< 20\%$ der Zellart aufwiesen, hoch war (Malikides et al. 2007). Aus diesem Grund wurde eine Probennahme von TBS 1-2 Stunden nach der Belastung in dieser Studie empfohlen, da es zu diesem Zeitpunkt noch erhöhte Werte an neutrophilen Granulozyten, zusammen mit vermehrtem Mukus, gibt (Malikides et al. 2007). Auf diese Weise könnte man eine mögliche Entzündung der unteren Atemwege sowie Veränderungen in der mukoziliären Clearance beobachten (Malikides et al. 2007). Studien zu Pferd und Mensch ergaben allerdings widersprüchliche Ergebnisse zu einer möglichen Erhöhung der mukoziliären Clearance nach der Belastung, welche zu erhöhten Werten an neutrophilen Granulozyten führen könnte (Willoughby et al. 1991; Wolff et al. 1977).

Bei der Belastung lungengesunder Pferde in kalter (-5°C) und warmer (25°C) Luft kam es nach 24 Stunden zu einer moderaten, aber signifikanten Erhöhung der neutrophilen Granulozyten bei kalter Luft ($15,9\% \pm 8,2$) im Vergleich zu warmer Luft ($11,0\% \pm 5,6$) sowie zu erhöhten mRNA Expressionen von Zytokinen der Th-2 Antwort und proinflammatorischer Zytokine wie unter anderem IL-8 (Davis et al. 2007). Es wurde vermutet, dass IL-8 chemotaktisch auf die neutrophilen Granulozyten wirkt und zu einem Einstrom der Zellen beiträgt (Davis et al. 2007). Außerdem konnte nach einer Belastung bei 4°C ein peripherer Epithelschaden in der Lunge durch signifikant erhöhte Werte an zilierten Epithelzellen in der BAL festgestellt werden (Davis et al. 2002). Dies wurde auf das Eindringen kalter Luft in die Atemwege zurückgeführt (Davis et al. 2002). Beim Hund konnte ebenfalls eine Atemwegsentszündung, Obstruktion, Hyperreaktivität sowie eine veränderte Bronchodilatation der Atemwege nach wiederholter Belastung mit kalter Luft festgestellt werden (Davis und Freed 2001).

Eine Aufstallung der Pferde führte zu einer signifikanten Erhöhung der neutrophilen Granulozyten bei gesunden Pferden in der BAL, was als nicht spezifische Antwort auf

vorhandenen Stallstaub gewertet wurde (Holcombe et al. 2001; Tremblay et al. 1993). Bei Studien zur Aufstallung von Pferden mit SEA (Heaves, RAO) kam es zu einer Erhöhung des Anteils der neutrophilen Granulozyten und zu keinen Veränderungen bei gesunden Pferden (Derksen et al. 1985; Robinson et al. 2003). Die gleichzeitig erhöhte Hustenfrequenz der Pferde korrelierte mit dem Anstieg der neutrophilen Granulozyten und wurde als sensitiver und spezifischer Indikator einer Atemwegobstruktion und Entzündung angesehen (Robinson et al. 2003). Gleichzeitig konnten bei einer Population von klinisch unauffälligen, leistungsfähigen Sportpferden in konventioneller Stallhaltung bei 100% der Tiere Anzeichen von subklinischem equinem Asthma gefunden werden (Gerber et al. 2003). Erhöhungen der neutrophilen Granulozyten wurden bereits bei >5% vermerkt und konnten bei der Mehrzahl der Pferde festgestellt werden (Gerber et al. 2003). Weitere abnormale Befunde stellten erhöhte Mukusmengen dar (Gerber et al. 2003). Die aktuell höher festgelegten Grenzwerte für neutrophile Granulozyten (>10%) zur Diagnosestellung von MEA (Couetil et al. 2016) würden die Ergebnisse dieser Studie und damit die hohe Prävalenz verändern. Dennoch konnte gezeigt werden, dass eine Atemwegsentzündung und eine Mukusakkumulation häufige Befunde in Stallhaltung sein können (Gerber et al. 2003).

Das Alter der Pferde hat ebenfalls Einfluss auf die Ergebnisse der BAL-Zytologie (Gerber et al. 2003; Hostetter et al. 2017; Pacheco et al. 2014). Bei älteren Pferden >20 Jahre wurden eine erhöhte Anzahl an Lymphozyten und eine geringere Anzahl an Makrophagen im Vergleich zu jüngeren festgestellt (Pacheco et al. 2014). Bei einer Woche und einem Monat alten Fohlen wurden signifikant weniger Lymphozyten (3,2% und 4,7%) als bei Jährlingen und adulten (45,5% und 48,7%) Pferden festgestellt (Hostetter et al. 2017). Bei der Beprobung über ein Jahr hinweg konnte bei Fohlen ein Anstieg der Lymphozytenzahl und ein absinkender Anteil an Makrophagen beobachtet werden (Hostetter et al. 2017). Die steigenden Werte an Lymphozyten bei jüngeren Pferden werden mit der Auseinandersetzung erhöhter Antigenexposition und erhöhter immunologischen Aktivität in Zusammenhang gebracht (Gerber et al. 2003; Hostetter et al. 2017). Des Weiteren wurden bei einigen Untersuchungen höhere Anteile an neutrophilen Granulozyten in der BAL und im TBS von älteren Pferden >10 Jahren gefunden (Hoffman 1999; Widmer et al. 2009), allerdings nicht bei allen (Gerber et al. 2003).

Eine erhöhte Kopfposition, wie beim Transport erforderlich, führt nach 12 bzw. 24 Stunden zu einer deutlich erhöhten Anzahl an Bakterien, einer Erhöhung des Anteils der neutrophilen Granulozyten im TBS sowie nach 12 Stunden bereits zu milden respiratorischen Symptomen (Racklyeft und Love 2006; Raidal et al. 1997). Somit hat auch ein längerer Transport vor der Probenentnahme Einfluss auf die zytologischen Ergebnisse.

Die Wichtigkeit eines standardisierten Protokolls zur Probenentnahme, Probenbearbeitung sowie ähnlicher Umwelteinflüsse (Haltung, Jahreszeit, Belastung, Transport) vor der

Probenentnahme wird durch die oben genannten Punkte verdeutlicht. Andernfalls könnte auch die Zytologie desselben Pferdes bei wiederholter Probenentnahme durch verschiedene Einflüsse variieren.

2.8 Zytologische Verdachtsdiagnosen und Zusammenhang zytologischer Ergebnisse mit klinischen Symptomen

Die Zytologie des TBS und der BAL soll unterstützend zur Diagnosestellung von MEA und SEA beitragen (Couetil et al. 2016). Bei der Auswahl der Probenart (TBS oder BAL) sollte berücksichtigt werden, dass es Unterschiede in den zytologischen Befunden und somit in der Diagnosestellung geben kann (Allen et al. 2006; Derksen et al. 1989; Malikides et al. 2003; Rossi et al. 2018). Die Unstimmigkeiten bei der Diagnosestellung zwischen TBS und BAL, basierend auf den Prozentzahlen der neutrophilen Granulozyten, wurden mit 37% bei der Diagnose von jungen Rennpferden mit Leistungsinsuffizienz und nur 17,5% bei einer Probennahme von 154 Pferden angegeben (Malikides et al. 2003; Rossi et al. 2018). Aus diesem Grund wird für eine komplette Beurteilung des unteren Atemtraktes die Probenentnahme von TBS und BAL empfohlen, wobei die BAL das Mittel der Wahl zur Identifikation von Mastzellen darstellt (Allen et al. 2006; Hughes et al. 2003).

Bei der Schwere der Erkrankung wird auf die Anteile der Entzündungszellen an der Gesamtzellzahl sowie auf weitere Hinweise einer chronischen Entzündung geachtet (Bedenice et al. 2008; Couetil et al. 2016; Couetil und Denicola 1999; Lavoie 2021). Bei der BAL gibt es durch das Consensus Statement der IAD (MEA) festgelegte Referenzwerte, ab denen MEA zytologisch definiert ist (Couetil et al. 2016). Die Definition beschreibt eine milde Erhöhung des Anteils an neutrophilen Granulozyten von >10% und/oder von Mastzellen und eosinophile Granulozyten von >5% (Bedenice et al. 2008; Couetil et al. 2016; Couetil und Denicola 1999; Fogarty und Buckley 1991; Hare und Viel 1998; Hoffman et al. 2003; Lavoie 2021). Es wurde bemerkt, dass ein Grenzwert von 5% neutrophilen Granulozyten zu streng gewählt ist und >10% neutrophile Granulozyten als diagnostischer Grenzwert besser geeignet ist, da wie oben beschrieben eine bessere Übereinstimmung zwischen beiden Lungenhälften erfolgt und unter anderem bereits die Stallhaltung der Pferde Einfluss auf die Zytologie haben kann (Depecker et al. 2014; Mazan 2018). Beim TBS werden >20% neutrophile Granulozyten im TBS bei Rennpferden als erhöht angesehen (Hoffman et al. 2003). Bei gesunden Quarterhorses ohne Leistungsinsuffizienz wurden allerdings $25 \pm 9,59\%$ neutrophile Granulozyten im TBS festgestellt (Azevedo et al. 2014). Des Weiteren konnte *Robinson et al.* bei mehr als 70% einer Population an Freizeitpferden >20% neutrophile Granulozyten nachweisen. Die Autoren empfehlen diesen Grenzwert nicht als einzigen Indikator für eine Atemwegsentzündung zu sehen (Robinson et al. 2006).

Weitere Studien zeigten, dass Pferde im Rennen höhere Anteile an neutrophilen Granulozyten im TBS aufwiesen und Pferde mit 20-50% im Vergleich zu <20% neutrophilen Granulozyten mit größerer Wahrscheinlichkeit eine höhere Leistungsbereitschaft zeigten (Holcombe et al. 2006; Widmer et al. 2009). Auch hier kann diskutiert werden, ob ein Grenzwert von 20% neutrophilen Granulozyten im TBS für Sportpferde und Freizeitpferde als zu stringent gewählt ist.

Bei MEA kommt es zu einer Vermehrung der schleimhaltigen Substanzen und einer dichteren Anordnung der Schleimfäden (Diekmann und Deegen 1990). Während die neutrophile Form mit mehr Mukus einhergeht, zeigt sich das mastzell- oder eosinophil-assoziierte Asthma mit weniger Schleim (Schwarz und Kühn 2021). Die meisten neutrophilen Granulozyten sind ausgereift mit nur milden Anzeichen einer Degeneration (Hodgson und Hodgson 2002). Tracheobronchialmukus von $\geq 2/5$ bei Rennpferden und $\geq 3/5$ bei Freizeit- und Sportpferden kann zur Diagnose von MEA beitragen (Couetil et al. 2016; Gerber et al. 2004).

Die BAL wird der TBS Zytologie für die Diagnose von MEA vorgezogen, da es Variationen in der Differenzialzellzählung im TBS gesunder Pferde gibt, die morphologische Darstellung und Identifikation der Zellen im TBS schlechter ist und kein Zusammenhang zwischen erhöhten Entzündungszellen (neutrophile Granulozyten) im TBS und einer Leistungsinsuffizienz festgestellt werden konnte (Couetil et al. 2016; Holcombe et al. 2006; Pirie 2017).

SEA wird bei einem Anteil von >25% neutrophilen Granulozyten in der BAL zytologisch diagnostiziert (Jean et al. 2011; Robinson 2001). Es kommt somit zu einer deutlichen Erhöhung nicht degenerierter, oft hypersegmentierter neutrophiler Granulozyten und einer verminderten Anzahl an Lymphozyten und Makrophagen als bei gesunden Pferden (Couetil et al. 2001; Jean et al. 2011; Pirie 2014). Das TBS ist charakterisiert durch eine dominierende Anzahl an neutrophilen Granulozyten, einer erhöhten Zelldichte und einer erhöhten Menge an Mukus (Diekmann und Deegen 1990). Erhöhte Mengen an Mukus sowie Curschmannspiralen geben wie bereits erklärt Hinweise auf eine Hyper- und Dyskrinie. Die Anzahl der neutrophilen Granulozyten nimmt mit der Schwere der Erkrankung zu (Diekmann und Deegen 1990). Weitere Hinweise auf eine chronische Entzündung sowie auf eine Störung der mukoziliären Clearance und eine Hyper- und Dyskrinie werden durch das Vorkommen von Fremdmaterial, eventuell extrazellulärer Bakterien, aktivierter Makrophagen, Curschmannspiralen und das Vorkommen von Becherzellen gewonnen (s. Kap. 2.7.4.). Bei SEA in Remission und MEA kann es zu Überlappungen der zytologischen Befunde kommen (Cian et al. 2015). Eine Akkumulation von Trachealmukus >2/5 kann ebenfalls hinweisend auf SEA sein, ist allerdings ebenfalls bei MEA zu finden (Couetil et al. 2016).

Die endgültige Diagnosestellung des EA sowie die Einteilung in einen Subtyp erfolgt als Zusammenspiel der klinischen, endoskopischen, zytologischen und mikrobiologischen Befunde (Couetil et al. 2016).

Einige Studien haben sich mit dem Zusammenhang zwischen bestimmten Zellarten in der BAL und im TBS und den klinischen und endoskopischen Befunden beschäftigt. Es konnte gezeigt werden, dass vermehrte Mengen an Trachealsekret mit verminderter Leistung einhergehen, da das Sekret die Atemwege verlegt und die Atemfunktion limitiert (Holcombe et al. 2006; Widmer et al. 2009). Ebenso konnte ein Zusammenhang zwischen erhöhten Mengen an Trachealmucus und Erhöhungen der neutrophilen Granulozyten im TBS festgestellt werden (Allen et al. 2006; Holcombe et al. 2006). Ein Zusammenhang zwischen dem Vorkommen an Trachealsekret und neutrophilen Granulozyten in der BAL wurde ebenfalls bei einigen aber nicht allen Studien beobachtet (Allen et al. 2006; Gerber et al. 2003; Koblinger et al. 2011).

Erhöhte Werte an neutrophilen Granulozyten in der BAL konnten in einigen Studien mit Leistungsinsuffizienz in Zusammenhang gebracht werden (Fogarty und Buckley 1991; Richard et al. 2010). In einer Studie zur Leistungsinsuffizienz bei Rennpferden konnten in 80% erhöhte Entzündungszellen, vor allem neutrophile Granulozyten (34%) und Mastzellen (57%) festgestellt werden (Ivester et al. 2018). Es wurde beobachtet, dass bei einer Erhöhung der Mastzellpopulation um 1% die Wahrscheinlichkeit zu gewinnen um 9% sank (Ivester et al. 2018). Pferde mit MEA zeigten Veränderungen im Blutgasaustausch bei Belastung sowie eine stärkere Hypoxämie als gesunde Kontrollgruppen (Couetil und Denicola 1999). Eine milde neutrophile Entzündung kann in einem Freizeitpferd unbeachtet bleiben, aber ausreichend für eine Leistungsinsuffizienz von Rennpferden sein (Holcombe et al. 2001).

Ein Zusammenhang besteht ebenfalls zwischen einer neutrophilen Atemwegsentszündung und vermehrtem Husten (Bedenice et al. 2008). Aus diesem Grund kann Husten als spezifischer und sensitiver Indikator für das Vorkommen einer vermehrten Anzahl an neutrophilen Granulozyten in der BAL und im TBS interpretiert werden (Hoffman et al. 2003; Bedenice et al. 2008; Christley et al. 2001; Christley et al. 2015).

Auch respiratorische Dysfunktionen können in Zusammenhang mit Veränderungen in der BAL-Zytologie gebracht werden, wobei auch Veränderungen der Lungenfunktion in subklinischen Erkrankungsformen vorkommen können (Richard et al. 2009). Mastzellen konnten mit einer Hyperreaktivität der Atemwege bei Pferden mit Leistungsinsuffizienz assoziiert werden, wobei die Mastzellprodukte zu einem Bronchospasmus, einer Verdickung der Atemwegswand und/oder dem Verlust der elastischen Funktion beitragen können (Bedenice et al. 2008; Hoffman et al. 1998). Die Rückgewinnungsrate der BAL ist signifikant geringer bei Pferden mit Erhöhungen in der Mastzellpopulation (Lavoie et al. 2011). Bei MEA konnte eine häufige Erhöhung der Mastzellpopulation beobachtet werden (Ivester et al. 2018; Ivester et al. 2014b; Mazan 2018). Des Weiteren konnte eine Korrelation von eosinophilen Granulozyten und der Atemwegsreaktivität bei jungen Rennpferden festgestellt werden, was den eosinophil-medierten Schaden am Epithel oder die Modulation des glatten Muskeltonus widerspiegeln kann (Hare und Viel 1998).

3 Material und Methoden

3.1 Ziele der Studie

Im Rahmen dieser Studie sollte die intra- und interindividuelle Varianz der zytologischen Ergebnisse sowie der zytologischen Diagnosestellung von TBS und BAL bei Pferden mit EA sowie lungengesunden Pferden untersucht werden. Dafür wurden luftgetrocknete Ausstriche von TBS und BAL an vier verschiedene Labore innerhalb Deutschlands verschickt sowie klinikintern durch zwei Untersucher zytologisch beurteilt.

Während der Studie fiel auf, dass die zytologische Befundung von TBS und BAL der einzelnen Labore besonders in Bezug auf die Angaben zur Differenzialzellzählung z.T. erhebliche Unterschiede aufwiesen. Zum einen wurden semiquantitative Angaben (Erklärung s. Kap. 2.7.3.), zum anderen Prozentzahlen (quantitative Werte) bei der Differenzialzellzählung angegeben. Durch diese Erkenntnisse wurde klar, dass ein interindividueller Laborvergleich mit den ursprünglichen TBS- und BAL-Befunden nicht möglich war.

Ziel der Arbeit war es daher zunächst die intraindividuelle Varianz der zytologischen Ergebnisse innerhalb der Labore zu untersuchen. Im Anschluss sollte die unterschiedliche zytologische Befundung von TBS und BAL durch verschiedene Labore evaluiert werden sowie ein vereinheitlichtes Scoring System zur zytologischen Befundung von TBS und BAL erarbeitet werden. Das vereinheitlichte Scoring System wurde schließlich zur Überprüfung der interindividuellen Varianz der verschiedenen Labore herangezogen. Auf diese Weise sollte die Validität der zytologischen Diagnostik von equinem Asthma bei Verlaufsuntersuchungen oder beim Wechsel eines Labors beurteilt werden.

3.1.1 Vorgehen

Für die Studie wurde Probenmaterial verwendet, das im Rahmen des genehmigten Projektes G 0156/21 gewonnen wurde. Zudem wurde Probenmaterial verwertet, das im Rahmen der von Besitzern beauftragten Untersuchung ihrer atemwegserkrankten Pferde gewonnen wurde, übrigblieb.

Es wurden Atemwegsuntersuchungen bei 15 Pferden durchgeführt, wobei die Pferde zur Abklärung von respiratorischen Symptomen an der Klinik für Pferde der Freien Universität Berlin vorgestellt wurden. Die Atemwegssymptome beinhalteten vor allem rezidivierenden oder anhaltenden Husten, Ruhedyspnoe, Leistungsinsuffizienz sowie ausbleibenden Therapieerfolg. Als Ergebnis der Atemwegsuntersuchungen ergaben sich drei Gruppen von Pferden mit unterschiedlichen Diagnosen mit jeweils fünf Probanden. Die erste Gruppe

bestand aus den lungengesunden Pferden, die zweite Gruppe aus Pferden mit MEA und die dritte Gruppe aus Pferden mit SEA.

Die Untersuchung des respiratorischen Systems in der Klinik für Pferde wurde in zwei Schritte unterteilt. Im ersten Schritt erfolgten eine klinische Allgemeinuntersuchung, eine spezielle Untersuchung des Atmungstraktes und die Entnahme von venösem und arteriellem Blut. Außerdem wurde eine Endoskopie der Atemwege inklusive der Entnahme von TBS sowie eine BAL durchgeführt. Eine Lungenfunktionsdiagnostik wurde im Rahmen der Atemwegsuntersuchung nicht durchgeführt, diese gehört allerdings ebenfalls zum Spektrum der Diagnostik des EA.

Der zweite Schritt beinhaltete die labordiagnostische Auswertung der Lungenproben (TBS und BAL). Dazu gehörte die Bearbeitung der Aspirate und Lavageflüssigkeiten inklusive der Anfertigung von zytologischen Ausstrichen. Im Rahmen der Abklärung respiratorischer Symptome der Patienten, erfolgte eine zytologische Untersuchung der Proben zunächst in der Klinik für Pferde der Freien Universität Berlin. Die Befunde der zytologischen Untersuchung wurden zusammen mit den Befunden der klinischen und endoskopischen Untersuchung sowie der Blutuntersuchung zur endgültigen Diagnosestellung in der Klinik herangezogen.

Anschließend erfolgte der Versand und die zytologische Untersuchung der TBS- und BAL-Ausstriche durch vier verblindete Fremdlabore. Um die Zuverlässigkeit der zytologischen Untersuchung ebenfalls in der Klinik für Pferde der Freien Universität Berlin zu untersuchen, wurden die Ausstriche durch zwei erfahrene, verblindete Untersucher der Klinik zytologisch untersucht. Für die Fremdlabore und die klinikinternen Untersucher wurden von jedem Pferd von den TBS- und BAL-Proben eigene Ausstriche angefertigt. Zusätzlich wurden von jedem Pferd ein doppelter Ansatz an Ausstrichen angefertigt und diese als zwei unterschiedliche Pferde verblindet an die Labore verschickt.

Im Verlauf der Studie fielen wie bereits beschrieben die unterschiedliche Befundung bzw. die unterschiedlichen Angaben zur Differenzialzellzählung von TBS und BAL der verschiedenen Labore auf. Daher wurden weitere Informationen zu den laborinternen Befundungen erfragt und anschließend ein Vergleich aufgestellt. Daraufhin wurde das vereinheitlichte Scoring System zur zytologischen Befundung von TBS und BAL erstellt um einen interindividuellen Laborvergleich ermöglichen zu können.

3.2 Patienten

3.2.1 Vorbericht und Signalement

Bei der Anamnese wurden Daten des Signalements der Pferde (Alter, Rasse, Geschlecht) erfragt. Des Weiteren wurden Informationen über den Vorstellungsgrund bzw. die

respiratorischen Symptome sowie den Krankheitsbeginn und Verlauf erfragt. Besonderes Interesse galt der Schwere der respiratorischen Symptome wie Leistungseinbußen, gelegentliches oder häufiges Husten und einer Ruhedyspnoe. Die Besitzer wurden ebenfalls zu bereits stattgefundenen Untersuchungen und Vorbehandlungen befragt.

3.2.2 Klinische Untersuchung

Die Pferde trafen am Vortag oder am Tag der Untersuchung in der Klinik ein. Bei Ankunft am selben Tag wurden die Pferde zunächst eingestallt und erst nach einer Orientierungsphase in der neuen Umgebung untersucht. Nach der Untersuchung des Atmungstraktes blieben die Pferde mindestens 24 Stunden zur Kontrolle der inneren Körpertemperatur und des Allgemeinbefindens im stationären Klinikaufenthalt.

Bei allen Patienten wurden eine klinische Allgemeinuntersuchung sowie eine spezielle Untersuchung des Respirationstraktes durchgeführt. Es wurde vor allem auf die Atemfrequenz, den Atemtyp sowie das Vorkommen von spontanem Husten geachtet. Die Atemfrequenz war erhöht bei über 16 Atemzügen pro Minute und der Atemtyp sollte costoabdominal sein. Des Weiteren wurde das Vorhandensein von Nasenausfluss sowie dessen Qualität beurteilt und die Auslösbarkeit von Husten durch Druck auf die erste Trachealspange überprüft. Die innere Körpertemperatur der Pferde wurde dokumentiert. Es erfolgte außerdem eine Lungenauskultation sowie Lungenperkussion. Bei der Lungenauskultation wurde das Lungenfeld sowie die Trachea abgehört und es wurden Veränderungen vom physiologischen Auskultationsbefund in Form einer geringgradig oder hochgradig inspiratorisch verschärften Atmung bis hin zu Giemen und Rasseln dokumentiert. Bei der Lungenperkussion wurde eine Vergrößerung des Lungenfeldes über die Lungengrenzen hinaus und deren Ausmaß dokumentiert. Die Untersuchung des Atmungstraktes erfolgte in Ruhe.

3.2.3 Arterielle Blutgasanalyse

Im Anschluss an die klinische Untersuchung erfolgte in unsediertem Zustand die arterielle Blutgasanalyse. Dazu wurde mit einer kleinlumigen 22G Kanüle etwa eine Handbreit proximal des Überganges zwischen Hals und Brust aus der rechten *Arteria carotis communis* arterielles Blut entnommen und in eine heparinisierte Blutgasspritze überführt. Direkt im Anschluss erfolgte die Analyse des arteriellen Blutes zur Überprüfung des Sauerstoff- (PaO₂) und Kohlenstoffdioxid- (PaCO₂) Partialdruckes.

Aus den Ergebnissen der arteriellen Blutgasanalyse (aBGA) wurde die alveolo-arterielle Sauerstoffpartialdruckdifferenz $p(A-a)O_2$ berechnet. Dazu wurde der aktuell vorherrschende Barometerdruck in mmHg (p_B), der Wasserdampfdruck der Alveolarluft (47mmHg) (p_{H_2O}) und der relative Sauerstoffanteil der Raumluft (20,95%) verwendet (Deegen und Klein 1986).

Formel:

$$p(A-a)O_2 = (p_B - p_{H_2O}) \times 0,2095 - p_{aO_2} - p_{aCO_2}$$

3.2.4 Blutanalyse

Für die anschließende endoskopische Untersuchung der Atemwege wurden die Pferde mit 0,02-0,04 mg/kg Detomidinhydrochlorid (Cepesedan RP, cp pharma) und 0,02-0,05 mg/kg Butorphanol (Butorgesic, cp pharma) sediert.

Im gleichen Schritt wurde venöses Blut zur Analyse der Leukozyten und zur Bestimmung des Serum Amyloid A Wertes (SAA) entnommen. Für Hinweise zum Ausschluss einer systemischen Entzündung oder Infektion wurden die Leukozyten zusammen mit dem SAA-Wert und der inneren Körpertemperatur beurteilt.

3.2.5 Bronchoskopie

Die Durchführung der Endoskopie erfolgte bei allen Pferden in einem Untersuchungsstand und in ausreichend sediertem Zustand. Zur Endoskopie wurde ein Videoendoskop (Karl Storz, Tuttlingen, Deutschland) mit einer Länge von 180cm und einem Außendurchmesser von 10mm verwendet. In den Arbeitskanal des Endoskops wurde ein Katheter zur Aspiration von TBS eingeführt, nach dem die Spitze des Katheters mit sterilem Gel umhüllt wurde. Das Endoskop wurde durch die Nüster in den ventralen Nasengang vorgeschoben bis der Larynx erreicht wurde. Der Pharynxbereich wurde in Bezug auf pharyngeale Hyperplasie aber auch andere Auffälligkeiten beurteilt. Ein weiteres Augenmerk lag auf der Stellung und Funktion der Aryknorpel zur Beurteilung einer *Hemiplegia laryngis*. Auch die Epiglottis wurde in ihrer Lage und weiteren Auffälligkeiten beurteilt. Die Farbe der Schleimhaut sowie bereits mögliche Schleimanheftungen im Pharynx- und Larynxbereich wurden dokumentiert. Anschließend wurde das Endoskop bei Inspiration in die Trachea vorgeschoben. Bei verstärktem Hustenreiz der Pferde wurde das Vorschieben des Endoskops um kurze Zeit verzögert. Beurteilt wurde die gesamte Länge der Trachea bis zur Bifurcatio tracheae. Mögliche Schleimanheftungen wurden nach dem Scoring System von *Gerber et al.* bezüglich der Menge und der Viskosität

beurteilt (Gerber et al. 2004). Dabei konnten bei der Menge und der Viskosität jeweils 0-5 Punkte vergeben werden.

Die Bifurcatio tracheae wurde ebenfalls beurteilt, wobei eine messerscharfe Aufzweigung als physiologisch angesehen wurde. Beim Vorschieben des Endoskops in Richtung Bifurcatio tracheae wurde, wenn möglich TBS aspiriert. Dies erfolgte, wie bereits in Kapitel 2.7.2.1. beschrieben. Bei den lungengesunden Pferden war die Trachea meist ohne Sekretanheftungen oder mit nur geringgradigen und wenig viskösen Akkumulationen von TBS versehen. In diesen Fällen wurde eine Tracheobronchiallavage wie bereits beschrieben mit 20 ml steriler Kochsalzlösung durchgeführt.

Nach Entnahme des TBS wurde der Katheter entfernt und ein neuer Katheter eingeführt. Über diesen wurde als Vorbereitung auf die Bronchoalveoläre Lavage 20 ml einer 2%igen Lidocainhydrochloridlösung im dorsalen Bereich der Bifurcatio tracheae auf die Schleimhaut appliziert, um die Hustenrezeptoren zu blockieren (Barton et al. 2007). Besonders bei Pferden mit SEA zeigt sich eine Hyperkontraktilität der peripheren Atemwege im Vergleich zu gesunden Pferden (Matusovsky et al. 2016). Anschließend wurden TBS-Katheter und Endoskop entfernt.

3.2.6 Bronchoalveoläre Lavage

Im Anschluss an die Endoskopie fand bei allen Pferden eine BAL zur Beprobung der peripheren Lungenanteile statt. Die BAL wurde blind mit Hilfe einer BAL-Sonde aus Silicon mit aufblasbarem Cuff, einer Länge von 300cm und einem Außendurchmesser von 10mm durchgeführt. Die Durchführung erfolgte so steril wie möglich durch zwei Personen. Eine Person schob die sterile BAL-Sonde wie in Kapitel 2.7.1.3 erklärt in einen distalen Bronchus der 4.-6. Generation vor. Bei verstärktem Hustenreiz der Pferde wurde die Untersuchung erneut für ca. 1-2 min unterbrochen, bis sich die Pferde wieder beruhigt hatten.

Dann erfolgte die Eingabe von 300 ml steriler phosphatgepufferter und erwärmter Kochsalzlösung (PBS) über drei 100 ml Spritzen. Die Kochsalzlösung wurde zügig mit leichtem Druck instilliert, um ein Abreißen der Flüssigkeitssäule zu verhindern. Im Anschluss wurde die Flüssigkeit durch dieselben 100 ml Spitzen wieder aspiriert. Dabei wurde darauf geachtet, nicht übermäßigen Unterdruck zu erzeugen, um ein Kollabieren des Bronchus zu verhindern. Das Erscheinen von weißlichem Schaum innerhalb der Flüssigkeit (*Surfactant*) wurde als Hinweis für eine erfolgreiche Probenentnahme aus den peripheren Atemwegen gewertet. Die gewonnene Flüssigkeit aus allen Spritzen wurde in das ursprüngliche Behältnis der phosphatgepufferten Kochsalzlösung gepoolt. Sobald keine weitere Flüssigkeit mehr aspiriert werden konnte, wurde die Luft aus dem Cuff entfernt und die BAL-Sonde aus den Atemwegen zurückgezogen.

3.3 Labordiagnostische Untersuchungen

3.3.1 Bearbeitung der Proben

Die BAL wurde zunächst makroskopisch auf das Vorhandensein von Schaum und Trübung sowie mögliche Beimengungen von Debris beurteilt. Das TBS so wie auch die BAL wurden innerhalb einer Stunde bearbeitet.

Aus dem TBS wurde ein mikrobiologischer Tupfer zur Überprüfung des Vorhandenseins pathogener Keime im Atemtrakt der Pferde entnommen und an das Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der Freien Universität Berlin geschickt. Anschließend wurden zytologische Ausstriche des TBS angefertigt. Dazu wurde ein stecknadelkopfgroßer Tropfen der Probe auf einen Objektträger gegeben und dieser wie ein Blutausstrich ausgestrichen (s. Kap. 2.7.2.3.). Besonders bei zähviskösen Ausstrichen wurde darauf geachtet, nicht zu viel Probenmaterial auf den Objektträger aufzutragen, um eine dünne Ausstrichoberflächliche zu gewährleisten. Auf diese Art und Weise wurden 12 TBS-Ausstriche pro Pferd angefertigt und luftgetrocknet.

Die Proben der Tracheobronchiallavage und der BAL wurden zunächst zentrifugiert, um eine ausreichende Zellularität zu erreichen. Die Zentrifugation erfolgte bei 1500 rpm für 10 min wobei die Proben gleichzeitig auf 4°C herunter gekühlt wurden (MS Laborgeräte). Bei der Tracheobronchiallavage wurde der Überstand abpipettiert und das Zellpellet mit der restlichen Flüssigkeit resuspendiert. Aus dieser Probe wurden wie bereits beschrieben die zytologischen Ausstriche angefertigt.

Bei der BAL wurde der Überstand abgekippt und wenn nötig weiterer Überstand abpipettiert. Das Zellpellet wurde mit der restlichen Flüssigkeit resuspendiert und es wurden ebenfalls wie oben beschrieben Ausstriche angefertigt. Auch hier wurde nur ein stecknadelkopfgroßer Tropfen der Probe auf den Objektträger aufgetragen. 12 Ausstriche der BAL wurden von jedem Pferd angefertigt, sodass schließlich von jedem Pferd insgesamt 24 Ausstriche für die Studie zur Verfügung standen.

3.3.2 Färbung und Trocknung

Eine ausreichende Lufttrocknung wurde innerhalb von 30min erreicht. Die Präparate, die zum Versand an die Labore vorgesehen waren, wurden nicht weiterbearbeitet.

Die Ausstriche, die klinikintern beurteilt wurden, wurden im Anschluss mit einer Diff-Quik-Färbung (Haema Schnellfärbung, Firma: Labor und Technik Eberhard Lehmann GmbH) angefärbt. Dafür wurden die Ausstriche nacheinander fünf Mal für jeweils eine Sekunde in drei verschiedene Lösungen eingetaucht. Die erste Lösung bestehend aus Methanol und Methyleneblau dient zur Fixierung, die weiteren zwei Lösungen sind Färbelösungen. Die erste

Färbelösung besteht aus Phosphatpuffer und Eosin und die zweite Färbelösung aus Phosphatpuffer und Azur.

Anschließend wurden die Ausstriche gründlich mit destilliertem Wasser abgespült, um überschüssige Färbelösung und zu dick aufgetragenes Probenmaterial zu entfernen. Die Ausstriche wurden erneut luftgetrocknet.

Die Färbung der Ausstriche, die für die klinikinterne Analyse vorgesehen waren, erfolgte sofort. Die verschickten Ausstriche wurden erst in den Laboren mit unterschiedlichen Färbungen (s. Kap. 3.5.1.) gefärbt.

3.3.3 Zytologische Analyse von TBS und BAL in der Klinik für Pferde

Die gefärbten Ausstriche des TBS und der BAL wurden zur abschließenden Diagnosestellung zunächst im Rahmen der Atemwegsuntersuchung in der Klinik für Pferde zytologisch beurteilt. Die Befunde der zytologischen Untersuchung dienten ebenfalls zur Diagnosestellung für die 15 Studienpferde.

3.4 Diagnosestellung und Einteilung der Studienpferde

Die Diagnosestellung im Rahmen der Atemwegsuntersuchung der 15 Pferde erfolgte als Zusammenspiel der klinischen, endoskopischen und zytologischen Auswertung. Alle Befunde der Untersuchungen wurden mit Hilfe des Scoring Systems von Barton und Gehlen eingestuft (s. Tab. 3) (Barton und Gehlen 2022). Bei der abschließenden Bewertung wurden 0–1 Punkte als gesund, 2–3 Punkte als geringgradig, 4–6 Punkte als mittelgradig, ≥ 7 Punkte als hochgradig erkrankt eingestuft. Auf diese Art und Weise ergaben sich aus den 15 Studienpferden 3 Gruppen mit unterschiedlichen Diagnosen.

Die Beurteilung der gesamten Befunde aller Untersuchungen, wie sie in der Klinik für Pferde erfolgt ist, stellt den Goldstandard zur Diagnosestellung dar. Die Diagnosen der Studienpferde, die im Rahmen der Atemwegsuntersuchung gestellt wurden, dienten daher als Grundlage für die weitere Studie und den Vergleich mit den zytologischen Diagnosen der Fremdlabore und auch der klinikinternen, verblindeten Untersucher.

Tabelle 3: Klinisches Scoring System nach Barton und Gehlen 2022.

Untersuchung	Befund	Punktezahl
Hustenauslösung (max. 1 Punkt)	Nicht auslösbar	0
	Mehrfach auslösbar	1
	Auswurf	1
	Spontaner Husten	1
Ruhedyspnoe (max. 3 Punkte)	Abdominale Atmung	1
	Verlängerte Expiration	1
	Einsinkende Intercostalräume	3
	Nüsternblähen	3
	Dampfrinne	3
	Afteratmung	3
Lungenperkussion (max. 2 Punkte)	Erweiterung 3 Finger	0
	Erweiterung Handbreit	1
	Erweiterung 2 Handbreit	2
Lungenauskultation (max. 2 Punkte)	Rasseln	2
	Knistern	2
	Giemen	2
Tracheobronchoskopie (max. 2 Punkte)	Sekret deutlich vermehrt u./o. mäßig viskös	1
	Sekret hochgradig vermehrt u./o. zähviskös	2
	Carina tracheae deutlich verdickt	1
BALF Zytologie (max. 3 Punkte)	Neutrophile Granulozyten <5%	0
	Neutrophile Granulozyten 5-10%	1
	Neutrophile Granulozyten 10-25%	2
	Neutrophile Granulozyten >25%	3
Blutgasanalyse (max. 2 Punkte)	AaDO ₂ 7-14 mmHg	1
	AaDO ₂ >14 mmHg	2

3.5 Überprüfung der intra- und interindividuellen Varianz zytologischer Ergebnisse

3.5.1 Auswahl und Angebot der Labore

Im nächsten Schritt der Studie wurden zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der zytologischen Untersuchung von TBS und BAL die Ausstriche durch vier weitere verschiedene Fremdlabore innerhalb Deutschlands sowie durch zwei Untersucher der Klinik für Pferde analysiert und beurteilt. Die Klinik für Pferde wird im Folgenden als fünftes Labor bezeichnet mit zwei verschiedenen Untersuchern A und B.

Die Voraussetzung für die Auswahl der Labore war zum einen ein entsprechendes Angebot der zytologischen Untersuchung von Ausstrichen und zum anderen die Möglichkeit einer verblindeten Analyse. Die Labore wussten somit nicht, dass sie die Ausstriche im Rahmen einer Studie analysierten.

In Tabelle 4 sind Informationen zu den Angeboten der zytologischen Untersuchung, den benötigten Materialien und den Kosten der Labore 1-5 zusammengestellt. Alle Informationen wurden aus den Untersuchungsanträgen, den Webseiten der Labore sowie durch direkten Kontakt (E-Mail oder Telefon) erhoben.

Die Einsendung von zytologischen Ausstrichen wird bei einigen Laboren, wegen der schlechten Probenqualität eingesandter Flüssigkeiten, bevorzugt. Flüssigkeiten müssen zwingend gekühlt und möglichst schnell (innerhalb von 24h) in den Laboren ankommen. Sollte in der Praxis oder Klinik die Möglichkeit zur Anfertigung eines Zytospinausstrichs bestehen, wird dies von den Laboren aufgrund der gleichmäßigen Probenverteilung bevorzugt. Außerdem sind bei einigen Laboren auch zwei oder mehr Ausstriche von TBS und/oder BAL gewünscht. Durch die Beurteilung mehrerer Ausstriche erhält man ein repräsentativeres Ergebnis der Zellzusammensetzung. Eine bakteriologische Untersuchung des Probenmaterials ist bei allen Laboren möglich.

Außerdem wurde aufgeführt, welche Färbungen für die Zytologie genutzt werden und welche Angaben sie zur Differentialzellzählung machen. Nicht alle Fremdlabore gaben Informationen zum Vorgehen bei der Differenzialzellzählung an oder haben diesbezüglich kein einheitliches Schema. Dies wurde durch die besonders in Ausstrichen des TBS vorkommende ungleichmäßige Zellverteilung begründet.

An die Labore wurden ungefärbte Ausstriche verschickt, sodass diese ihre laborinterne Färbung nutzen konnten.

Tabelle 4: Laborangebote zur zytologischen Untersuchung von TBS und BAL.

Labore	Angebote	benötigtes Material	Angaben zur Differentialzellzählung	Färbung	Kosten (Nettopreis)
Labor 1	Zytologische Untersuchung luftgetrockneter Ausstriche oder Nativflüssigkeit	Ausstriche und/oder Nativflüssigkeit in EDTA	semiquantitative Angaben bei TBS und BAL, Auswertung von ca. 5 Gesichtsfeldern/Ausstrich	Pappenheim	30€ (TBS/BAL); 60€ (TBS+BAL)
Labor 2	Zytologische Untersuchung oder zytologische Untersuchung mit Mehraufwand	bis zu 4 Ausstriche oder 1x Flüssigkeit und max. 2 Ausstriche oder 5-6 Ausstriche oder 2 Lokalisationen oder 1x Flüssigkeit und mehr als 2 Ausstriche	semiquantitative Angaben bei TBS und BAL, kein einheitliches Schema zum Vorgehen	Diff Quik	41,50€
	BAL Profil mit Zytologie und bakteriologischer und mykologischer Untersuchung	keine Angaben			55€
Labor 3	Zytologische Untersuchung luftgetrockneter Ausstriche	Ausstriche (max. 4)	Prozentangaben bei TBS und BAL; Zählung 300 kernhaltiger Zellen	modifizierte Wright Giemsa	60,30€
	BAL Profil (Zytologie und Zellkonzentration mit oder ohne bakterieller Untersuchung); Zytospin möglich	mind. 20 ml BAL Flüssigkeit aufgeteilt in EDTA und nativ (ohne Additivum); Ausstriche; bei Bedarf BU Tupfer mit Medium			71,10€; 93€ (mit BU)
	Zytologie sonstiger Flüssigkeiten	Flüssigkeit in EDTA und Ausstriche			64,80€
Labor 4	Zytologische Untersuchung von Aspiraten/ Ausstrichen	Bevorzugt Ausstriche; auch möglich mind. 10ml konservierte Spülflüssigkeit (5-10%iges Formalin)	Prozentangaben für den Ausstrich mit der höheren Zellularität (TBS oder BAL)	Pappenheim	60€
Labor 5	Zytologische Untersuchung von TBS und/oder BAL	Luftgetrockneter Ausstriche bevorzugt; (Nativflüssigkeit möglich)	Semiquantitative Angaben bei TBS, Prozentangaben bei BAL (Zählung 400 Zellen)	Diff Quik	37€ (TBS/BAL); 55,50€ (TBS+BAL)

3.5.2 Aufteilung der Proben und Versand

Insgesamt wurden von jedem Pferd bei der einmaligen Probennahme gleichzeitig jeweils 12 Ausstriche des TBS und der BAL angefertigt. Zur Untersuchung der intraindividuellen Varianz wurden die Ausstriche eines Pferdes auf zwei neue „fiktive“ Pferde (6 TBS und 6 BAL-Ausstriche pro Pferd) aufgeteilt. So wurden aus den Proben eines Pferdes zwei Proben a und b des gleichen Pferdes geschaffen. Aus den beprobten 15 Pferden wurden so 30 Pferde. Jedes Labor bzw. Untersucher erhielt somit einen TBS- und einen BAL-Ausstrich pro Pferd (s. Abb. 7). Auf diese Weise untersuchten alle Labore/Untersucher zweimal verblindet die Proben a und b desselben Pferdes.

Alle 30 Pferde erhielten neue Namen, ein neues Signalement (Alter, Geschlecht) sowie unterschiedliche Vorberichte. Diese Informationen wurden für jedes Pferd in einem Untersuchungsantrag des jeweiligen Labors angegeben. Der Vorbericht enthielt Angaben zur Haltung, Fütterung, den klinischen Symptomen sowie den endoskopischen Befunden der Pferde. Die Vorberichte wurden so konzipiert, dass zwei Pferde mit den gleichen Proben unterschiedliche klinische Symptome, unterschiedliche Befunde in der Atemwegsuntersuchung und unterschiedliche Angaben zum Management erhielten. Auf diese Art und Weise konnte kein Zusammenhang zwischen den eigentlich identischen Pferden hergestellt werden und den Untersuchern gelang es nicht immer einen Zusammenhang zwischen Vorbericht und zytologischem Befund zu erkennen, sodass die zytologische Analyse und Diagnose im Vordergrund standen.

Der Versand der Ausstriche erfolgte nach der Diagnosestellung in der Klinik für Pferde innerhalb von zwei Tagen nach der Probenentnahme. Dabei wurden die gleichen Proben eines Pferdes aufgeteilt auf zwei Pferde zeitversetzt versandt, sodass die Proben in den Fremdlaboren nicht gleichzeitig beurteilt wurden.

Die Proben wurden in dafür vorgesehenen Transportbehältern und einem zusätzlich gepolsterten Briefumschlag versandt.

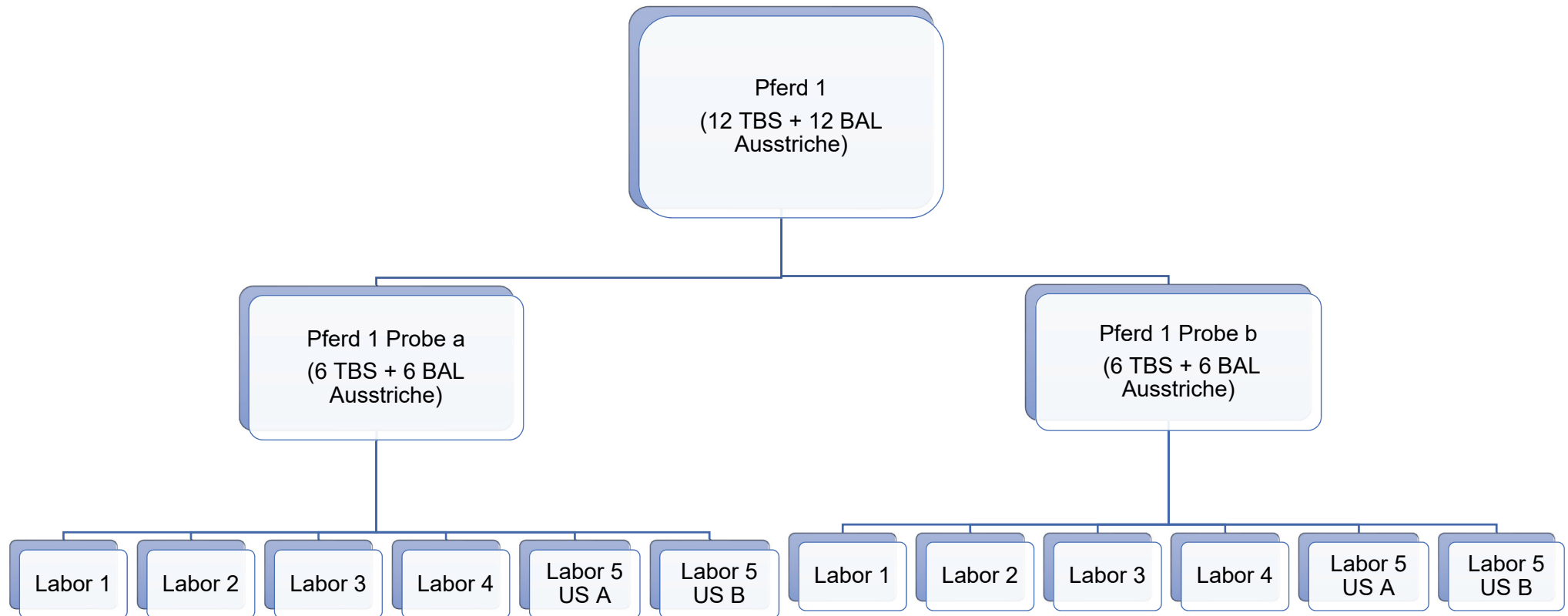


Abbildung 7: Aufteilung der Ausstriche von TBS und BAL beispielhaft an einem Pferd, US: Untersucher.

3.5.3 Verblindete, zytologische Untersuchung in der Klinik für Pferde

Um die Reproduzierbarkeit zytologischer Ergebnisse innerhalb der Klinik für Pferde der Freien Universität Berlin zu überprüfen, wurden alle Ausstriche ebenfalls klinikintern durch zwei erfahrene, verblindete Untersucher (A und B) beurteilt. Dies erfolgte nach Abschluss der Atemwegsuntersuchung der Studienpferde. Die Untersucher beurteilten unabhängig voneinander und verblindet die Proben von 30 Pferden an unterschiedlichen Tagen. Dabei wurden nie die gleichen Proben eines Pferdes am selben Tag beurteilt.

Die zytologischen Untersuchungen in der Klinik durch die zwei Untersucher erfolgten mittels Lichtmikroskop (Olympus BX 41) bei TBS und BAL. Dazu wurden zunächst die Ausstriche in 100-facher Vergrößerung beurteilt, um einen Überblick über den Ausstrich und einen Eindruck über die Zelldichte und Zellverteilung zu erlangen. Dabei wurde der gesamte Ausstrich untersucht. Außerdem wurden erste Informationen über das Vorkommen verschiedener Zellarten und weiterer Materialien gewonnen. Des Weiteren wurden semiquantitative Angaben zum Gehalt an Mukus notiert.

Anschließend erfolgte bei 500-1000-facher Vergrößerung und Ölimmersion die Beurteilung einzelner Zellpopulationen und weiterer Strukturen bei TBS und BAL. Dafür wurde beim TBS der Ausstrich mäanderförmig analysiert, um eine möglichst repräsentative Auswertung des gesamten Ausstrichs zu erhalten. Eine Differentialzellzählung der Entzündungszellen sowie eine Beurteilung des Funktionszustandes der Zellen wurde bei beiden Probenarten durchgeführt. Beurteilt wurden hierbei Makrophagen, neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, eosinophile Granulozyten und Mastzellen. Epithelzellen wurden als kernhaltige Zellen ebenfalls beurteilt aber nicht mit in die Differentialzellzählung aufgenommen.

Beim TBS wurden semiquantitative Angaben zur Differentialzellzählung der Entzündungszellen angegeben. Bei den Makrophagen wurden darüber hinaus Angaben über das Vorhandensein einer Doppel- oder Mehrkernigkeit (Riesenzellen), über die Phagozytose von Fremdmaterial, Bakterien oder anderen Zellen und über das Auftreten von schaumigen Makrophagen gemacht. Ein degeneratives (lytisches) Aussehen der neutrophilen Granulozyten wurde ebenfalls erwähnt. Darüber hinaus wurden semiquantitative Angaben zu Epithelzellen, Creolakörperchen und Becherzellen gemacht. Auch Curschmannspiralen, Hyphen und Konidien, weitere Materialien sowie intra- oder extrazelluläre Bakterien wurden in Form von semiquantitativen Angaben dokumentiert. In Tabelle 5 ist der klinikinterne Befundbogen zur zytologischen Analyse von TBS dargestellt.

Die zytologische Auswertung der BAL erfolgte ähnlich wie bereits beim TBS beschrieben. Für die Differentialzellzählung wurden hierbei allerdings mindestens 400 kernhaltige Zellen, ausgenommen Epithelzellen, gezählt. Dafür wurden verschiedene Lokalisationen über den gesamten Ausstrich hinweg beurteilt, um auch hier ein repräsentatives Ergebnis zu erhalten. Die quantitativen Ergebnisse wurden in Prozentzahlen für jeden Zelltyp angegeben. Darüber

hinaus wurde das Vorhandensein weiterer Strukturen wie beim TBS dokumentiert und Angaben zum Funktionszustand der Zellen gemacht. In Tabelle 6 ist der Befundbogen zur zytologischen Analyse der BAL dargestellt.

Tabelle 5: Zytologischer Befundbogen des TBS der Klinik für Pferde der Freien Universität Berlin.

Qualität des Ausstrichs							
Zelldichte	ggr. ()			mgr. ()		hgr. ()	
Makrophagen	- ()	+ ()		++ ()		+++ ()	
		Schaumig ()		Hämosiderin ()		Phagozytose ()	
Neutrophile Granulozyten	- ()	(+)()	+ ()	++ ()	+++ ()	++++ ()	Lysis ()
Lymphozyten	- ()	(+)()	+ ()	++ ()	+++ ()	++++ ()	
Eosinophile Granulozyten	- ()	(+)()	+ ()	++ ()	+++ ()	++++ ()	
Mastzellen	- ()	(+)()	+ ()	++ ()	+++ ()	++++ ()	
Kreola-Körperchen	- ()	+ ()		++ ()		+++ ()	
Epithelzellen	- ()	+ ()		++ ()		+++ ()	
Becherzellen	- ()	+ ()		++ ()		+++ ()	
Jugendliche Becherzellen	- ()	+ ()		++ ()		+++ ()	
Riesenzellen	- ()	+ ()		++ ()		+++ ()	
Curschmann-Spiralen	- ()	(+)()	+ ()	++ ()		+++ ()	
Hyphen und Konidien	- ()	+ ()		++ ()		+++ ()	
Bakterien intrazellulär () extrazellulär ()	- ()	+ ()		++ ()		+++ ()	
Mukus	- ()	+ ()		++ ()		+++ ()	

Tabelle 6: Zytologischer Befundbogen der BAL der Klinik für Pferde der Freien Universität Berlin.

Qualität der Probe			
Zelldichte	ggr. ()	mgr. ()	hgr. ()
Makrophagen (%)			
	Phagozytose ()	Mehrkernigkeit ()	Hämosiderohagen ()
Neutrophile Granulozyten (%)			Lyse ()
Lymphozyten (%)			
Eosinophile Granulozyten (%)			
Mastzellen (%)			
Mucus	+ ()	++ ()	+++ ()
Curschmannspiralen	- ()	+ ()	
Epithelzellen	+ ()	++ ()	+++ ()
Bakterien	- ()	intrazellulär ()	extrazellulär ()
Hyphen und Konidien	- ()	+ ()	
weitere Materialien			

3.5.4 Befundung der Fremdlabore

Die Ergebnisse der Fremdlabore wurden als Untersuchungsbefunde an die Klinik für Pferde der Freien Universität Berlin geschickt. Diese beinhalteten Ergebnisse zu folgenden Parametern, die in der zytologischen Untersuchung beurteilt wurden:

- Zelldichte
- Alveolarmakrophagen
- Neutrophile Granulozyten
- Lymphozyten
- Eosinophile Granulozyten
- Mastzellen (BAL)
- doppel- oder mehrkernige Zellen
- Mucus
- Curschmannspiralen
- Epithelzellen
- Fremdmaterial (Pollen, Hyphen, Konidien)
- Bakterien

Diese Parameter wurden in der anschließenden Auswertung miteinander verglichen.

Es wurden nicht immer Ergebnisse zu allen Parametern bei den Befundungen angegeben.

In die Differenzialzellzählung aufgenommene Zellarten waren Alveolarmakrophagen, neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, eosinophile Granulozyten und Mastzellen, bei einem Labor zusätzlich die Epithelzellen. Im TBS wurden nur äußerst vereinzelt Angaben zu Mastzellen gemacht, daher wurde diese Zellart im Weiteren nur in der BAL berücksichtigt. Die Differentialzellzählung des TBS erfolgte semiquantitativ bei zwei der vier Fremdlabore. Prozentuale Angaben wurden bei zwei der vier Labore für das TBS gemacht. Auch die Differenzialzellzählung der BAL erfolgte bei zwei Laboren semiquantitativ. Die anderen zwei Labore gaben hierbei Prozentangaben für die Zellarten an. Weitere Ergebnisse der Befundungen, die Befundinterpretationen sowie Informationen über die zytologischen Verdachtsdiagnosen der Labore werden in Kapitel 5.2. beschrieben.

Die semiquantitativen Angaben der Labore wie geringgradig, mittelgradig, hochgradig oder dominierend stellten absolute Anteile der Zellart am gesamten Zellbild dar und bedeuteten keine pathologische Vermehrung der Zellart, d.h. nicht mittelgradig vermehrte Zellen, sondern ein mittelgradiger Anteil der Zellart am gesamten Zellbild.

Durch die Befundbögen der Labore wurden bereits erste Informationen und Erkenntnisse über die Gradeinteilungen der semiquantitativen Begrifflichkeiten zu den einzelnen Zellarten und weiteren Strukturen gewonnen (vereinzelt, geringgradig, mittelgradig, hochgradig, dominierend, usw.). Da diese aber nicht immer sicher in eine Größenreihenfolge eingeteilt werden konnten (bedeuten z.B. zahlreich oder etliche eine größere Menge an Zellen), wurde bei den Laboren eine genaue Reihenfolge der Gradeinteilungen im Nachgang erfragt. Zur Veranschaulichung wurden die Angaben zur Befundung der genannten Parameter aller Labore in den Tabellen 4 und 5 im Anhang aufgeführt.

Zwischenstufen der semiquantitativen Begriffe wie geringgradig bis mittelgradig wurden laborübergreifend immer der niedrigeren Stufe zugeordnet. Um eine statistische Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurde darauf verzichtet die Zwischenstufen extra aufzuführen, da es sonst bei einigen Parametern unverhältnismäßig viele Einteilungsmöglichkeiten gegeben hätte.

3.5.5 Intraindividuelle Varianz der Ergebnisse

Im ersten Teil der Auswertung wurde die Übereinstimmung der zytologischen Untersuchung innerhalb der Fremdlabore und innerhalb der Untersucher A und B der Klinik für Pferde überprüft. Dazu wurden die Ergebnisse der zytologischen Untersuchung eines Pferdes, aufgeteilt auf zwei „neue“ Pferde (a und b), innerhalb der Labore miteinander verglichen. Jedes

Pferd erhielt durch die Aufteilung der Proben des gleichen Pferdes zu jedem der beurteilten Parameter z.B. Makrophagen (s. Kap. 3.5.3.) zwei Ergebnisse (Probe a und b des gleichen Pferdes), die miteinander verglichen wurden. Beurteilt wurde somit die intraindividuelle Varianz der Ergebnisse der Proben a und b innerhalb der Labore zu den genannten Parametern, die bei der Befundung beurteilt wurden.

Die semiquantitativen Begriffe wurden für die statistische Auswertung mit Hilfe der jeweiligen Bewertungsschemata der Labore in kategoriale Daten überführt (s. Tab. 4 und 5 im Anhang). Die Prozentangaben einiger Labore wurden direkt als metrische Daten zum Vergleich herangezogen.

Hierbei ist zu beachten, dass die Labore unterschiedliche Angaben zur Differenzialzellzählung gemacht haben (semiquantitativ oder prozentual) und diese statistisch unterschiedlich ausgewertet werden mussten (s. Kap. 4). TBS und BAL wurden unabhängig voneinander bewertet, da sich das zytologische Bild beider Proben unterschiedlich darstellen kann.

Anzumerken ist, dass es sich um die Proben desselben Pferdes handelt, die am selben Tag bei nur einer Untersuchung der Atemwege entnommen wurden, die Labore und Untersucher allerdings nicht dieselben Ausstriche beurteilt haben. Es wurden initial für jedes Labor oder Untersucher eigene Ausstriche angefertigt, sodass man von einer Variabilität der Ausstrichqualität, Zelldichte und Zellverteilung sowie Verteilung weiterer Strukturen auf den Objektträgern ausgehen muss. Aus diesem Grund können gewisse Unterschiede bei der Befundung der Ausstriche eines Pferdes vorkommen.

3.5.6 Interindividuelle Varianz der Ergebnisse

Im zweiten Teil der Auswertung sollte die interindividuelle Varianz der zytologischen Ergebnisse zwischen allen Laboren und Untersuchern zu den Proben eines Pferdes beurteilt werden. Mehrfach ist bereits auf die Problematik eines Vergleichs zwischen den Laboren hingewiesen worden. Hierbei sind die unterschiedlichen Bewertungsschemata der Labore aufzuführen. Zum einen erfolgten die Bewertungen der Differentialzellzählung semiquantitativ oder prozentual (quantitativ) und zum anderen stuften die Labore die semiquantitativen Begriffe in unterschiedliche viele Grade bei den verschiedenen Zellarten ein.

Bei der Bewertung der Makrophagen im TBS gibt es somit bei einem Labor fünf Möglichkeiten der Gradeinteilung der semiquantitativen Begriffe (vereinzelt, wenige, einige, zahlreich, etliche, massenhaft), bei dem nächsten fünf (vereinzelt, geringgradig, mittelgradig, hochgradig, dominierend) und bei einem weiteren drei Möglichkeiten (geringgradig, mittelgradig, hochgradig). Die Ergebnisse waren so statistisch nicht auswertbar, da metrische (Prozentangaben), ordinale und nominale Daten (semiquantitative Begriffe) vorlagen. Ebenso

wenig war zu diesem Zeitpunkt ein Vergleich zwischen den Laboren, die semiquantitativ bewerteten, aufgrund der Einstufung der Begriffe in unterschiedlich viele Grade, möglich.

Das Ziel war es dennoch die zytologischen Untersuchungen der Proben eines Pferdes durch alle Untersucher zu vergleichen und so die interindividuelle Varianz auszumachen. Aus diesem Grund wurde eine Möglichkeit gesucht, die Bewertungsschemata der Labore zu vereinheitlichen. Die quantitativen und semiquantitativen Ergebnisse mussten vergleichbar gemacht werden und daher war die Idee, die semiquantitativen Gradeinteilungen der verschiedenen Labore zu definieren. Diese Definition sollte die Zuordnung einer prozentualen Spannbreite der Anteile einer Zellart am Gesamtzellbild (z.B. 20-40%) zu den semiquantitativen Begriffen (z.B. mittelgradig) darstellen. Auf diese Weise sollte ein vereinheitlichtes Schema der Begriffsdefinitionen erstellt werden und die Prozentwerte den passenden semiquantitativen Begriffen zugeordnet werden, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu ermöglichen.

Bei allen Laboren bzw. Untersuchern, die semiquantitative Begrifflichkeiten bei der zytologischen Untersuchung von TBS und/oder BAL nutzten, wurden Definitionen der laborintern genutzten semiquantitativen Begriffe erfragt. Durch die Definitionen sollte herausgefunden werden was eine „mittelgradige Anzahl“ an neutrophilen Granulozyten im TBS oder in der BAL für die verschiedenen Labore genau bedeutet. Außerdem sollten Angaben dazu gemacht werden, ob es Unterschiede zwischen den Definitionen der einzelnen Zellarten und zwischen TBS und BAL gibt. Die Erklärungen beziehen sich nur auf die an der Differentialzellzählung beteiligten Zellarten.

Die Schwierigkeit zur Angabe dieser Prozentwerte besteht darin, dass die Ausstriche eine unterschiedliche Zellularität aufweisen und daher je nach Zelldichte die semiquantitativen Begriffe unterschiedlich gewählt werden. Wird so in einem zellarmen Ausstrich eine geringgradige Anzahl einer Zellart angegeben, kann diese dennoch der vorherrschende Zelltyp sein. Somit gibt es eine gewisse Divergenz der semiquantitativen und prozentualen Angaben. Aus diesem Grund spielt der Anteil der Zellart am Gesamtzellbild aber auch der Zellgehalt des Ausstrichs eine Rolle für die Bewertung. Bei den Definitionen der semiquantitativen Angaben wird aus diesem Grund von einer angemessenen Zellularität des Ausstrichs ausgegangen.

In den Tabellen 7 und 8 werden die Befundungsschemata der Labore 1-5 (Labor 5: Klinik für Pferde) sowie die prozentualen Spannbreiten zur Definition der semiquantitativen Begriffe bei TBS und BAL angegeben.

Auffällig bei der Gegenüberstellung sind die Definitionen des Labors eins, das für jede Zellart und für beide Probenarten (TBS und BAL) dieselben prozentualen Spannbreiten für die semiquantitativen Begriffe angibt. Somit bedeuten „einige“ Makrophagen, neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten und Mastzellen ein Vorhandensein der Zellarten am Gesamtzellbild von 20-40%. Hierbei gibt es keine Unterscheidung zwischen den Zellarten oder der Probenart (TBA und BAL). Somit stellen „einige“ neutrophile Granulozyten im TBS und in der BAL einen Anteil von 20-40% am Gesamtzellbild dar.

Ein weiteres Labor unterscheidet bei den Definitionen zwischen jeder Zellart, sodass ein „geringgradiger Gehalt“ bei den Makrophagen im TBS ein Anteil von 10-40%, bei neutrophilen Granulozyten nur einen Anteil von 5-20% und bei eosinophilen Granulozyten einen Anteil von 1-5% bedeutet. Darüber hinaus wurde bei der Definition der semiquantitativen Begriffe zwischen TBS und BAL unterschieden. So bedeutet ein „mittelgradiger Gehalt“ an neutrophilen Granulozyten im TBS einen Anteil von 20-50% am Gesamtzellbild, in der BAL lediglich 10-25%.

Das dritte Labor mit einer semiquantitativen Bewertung bei der Differentialzellzählung des TBS gab wiederum andere Definitionen an. So bedeutet „wenige“ oder ein „geringgradiger Gehalt“ an Lymphozyten bei einem Labor 10-20%, bei dem nächsten 10-30% und beim letzten 20-35% dieser Zellpopulation am Gesamtzellbild. Weitere Informationen sind aus den Tabellen 7 und 8 zu entnehmen.

Da nun auch die Definitionen und nicht nur die Anzahl der Graduierungsmöglichkeiten der semiquantitativen Begriffe Unterschiede zwischen den Laboren aufwiesen, führte auch dieser Ansatz nicht zu einer Vergleichbarkeit der Ergebnisse.

Die deutlich gewordene Problematik bei der Vergleichbarkeit der zytologischen Bewertung von TBS und BAL führte dazu, dass im Rahmen dieser Studie ein Vorschlag für ein vereinheitlichtes Scoring System erarbeitet wurde, um zytologische Ergebnisse verschiedener Labore miteinander vergleichen zu können.

Es ist anzumerken, dass der Goldstandard zur Diagnostik von equinem Asthma die prozentuale Auswertung der Differentialzellzählung der BAL ist (Couetil et al. 2016). Dennoch bewerten einige Labore die Differenzialzellzählung der BAL semiquantitativ.

Tabelle 7: Angaben der prozentualen Spannweiten zur Definition der semiquantitativen Begrifflichkeiten beim TBS, %: Prozentangaben.

Parameter	Labor 1		Labor 2		Labor 3	Labor 4		Labor 5	
Alveolarmakrophagen	1	vereinzelt (<10%)	1	vereinzelt (<10%)	%	%	1	ggr. (0-35%)	
	2	wenig (10-20%)	2	ggr. (10-40%)			2	mgr. (35-70%)	
	3	einige (20-40%)	3	mgr. (40-70%)			3	hgr. (>70%)	
	4	zahlreich (40-60%)	4	hgr. (>70%)					
	5	etlich (60-80%)	5	dominierend (>90%)					
	6	massenhaft (>80%)							
Neutrophile Granulozyten	1	vereinzelt (<10%)	1	vereinzelt (<5%)	%	%	1	vereinzelt (<10%)	
	2	wenig (10-20%)	2	ggr. (5-20%)			2	ggr. (10-30%)	
	3	einige (20-40%)	3	mgr. (20-50%)			3	mgr. (30-50%).	
	4	zahlreich (40-60%)	4	hgr. (>50%)			4	hgr. (50-70%)	
	5	etlich (60-80%)	5	dominierend (>90%)			5	dominieren (>70%)	
	6	massenhaft (>80%)							
Lymphozyten	1	vereinzelt (<10%)	1	vereinzelt (<10%)	%	%	1	vereinzelt (<20%)	
	2	wenig (10-20%)	2	ggr. (10-30%)			2	ggr. (20-35%)	
	3	einige (20-40%)	3	mgr. (30-50%)			3	mgr. (35-55%)	
	4	zahlreich (40-60%)	4	hgr. (>50%)			4	hgr. (55-70%)	
	5	etlich (60-80%)	5	dominierend (>90%)			5	dominierend (>70%)	
	6	massenhaft (>80%)							
Eosinophile Granulozyten	1	vereinzelt (<10%)	1	vereinzelt (<1%)	Keine Werte	1	<1%	1	vereinzelt (<1%)
	2	wenig (10-20%)	2	ggr. (1-5%)		2	>1%	2	ggr. (1-5%)
	3	einige (20-40%)	3	mgr. (5-10%)				3	mgr. (5-10%)
	4	zahlreich (40-60%)	4	hgr. (>10%)				4	hgr. (>10%)
	5	etlich (60-80%)							

Tabelle 8: Angaben der prozentualen Spannweiten zur Definition der semiquantitativen Begrifflichkeiten bei der BAL, %: Prozentangaben.

Parameter	Labor 1		Labor 2		Labor 3	Labor 4	Labor 5
Alveolarmakrophagen	1	vereinzelt (<10%)	1	vereinzelt (<10%)	%	%	%
	2	wenig (10-20%)	2	ggr. (10-50%)			
	3	einige (20-40%)	3	mgr. (40-70%)			
	4	zahlreich (40-60%)	4	hgr. (>70%)			
	5	etlich (60-80%)	5	dominierend (>90%)			
	6	massenhaft (>80%)					
Neutrophile Granulozyten	1	vereinzelt (<10%)	1	vereinzelt (<5%)	%	%	%
	2	wenig (10-20%)	2	ggr. (5-10%)			
	3	einige (20-40%)	3	mgr. (10-25%)			
	4	zahlreich (40-60%)	4	hgr. (>25%)			
	5	etlich (60-80%)	5	dominierend (>90%)			
	6	massenhaft (>80%)					
Lymphozyten	1	vereinzelt (<10%)	1	vereinzelt (<10%)	%	%	%
	2	wenig (10-20%)	2	ggr. (10-30%)			
	3	einige (20-40%)	3	mgr. (30-50%)			
	4	zahlreich (40-60%)	4	hgr. (>50%)			
	5	etlich (60-80%)	5	dominierend (>90%)			
	6	massenhaft (>80%)					
Eosinophile Granulozyten	1	vereinzelt (<10%)	1	vereinzelt (<10%)	%	%	%
	2	wenig (10-20%)	2	ggr. (1-5%)			
	3	einige (20-40%)	3	mgr. (5-10%)			
	4	zahlreich (40-60%)	4	hgr. (>10%)			
	5	etlich (60-80%)					
Mastzellen	1	vereinzelt (<10%)	1	vereinzelt (<10%)	%	%	%
	2	wenig (10-20%)	2	ggr. (1-5%)			
	3	einige (20-40%)	3	mgr. (5-10%)			
			4	hgr. (>10%)			

3.6 Erstellung eines vereinheitlichten Scoring Systems zur zytologischen Untersuchung

Nach dem Wissen der Autorin gibt es in der Literatur keine Informationen zur Einteilung und Definition semiquantitativer Angaben zur Differenzialzellzählung bei der zytologischen Untersuchung von TBS und BAL. Daher wurde ein vereinheitlichtes Scoring System mit semiquantitativen Begriffen und prozentualen Werten für alle oben genannten Parameter erstellt (s. Tab. 14 und 15).

Dafür wurden die Informationen und Definitionen der einzelnen Labore zusammen mit der klinikinternen Befundung genutzt und eine Vereinheitlichung der Befundungsmöglichkeiten vorgenommen. In den Tabellen 9 und 10 sind die aktuellen Angaben der fünf Labore (Fremdlabore und Klinik für Pferde) zur Differentialzellzählung im TBS und in der BAL aufgeführt. In den Tabellen 11 und 12 sind die Empfehlungen zur einheitlichen Befundung der Differentialzellzählung aufgeführt (Couetil et al. 2016). Bei der BAL wäre gewünscht, dass alle Labore Prozentangaben zur Differentialzellzählung machen, da auch die Referenzwerte zur Einteilung der Schweregrade bei equinem Asthma in Prozenten angegeben sind (Couetil et al. 2016). Im TBS wurden bei fast allen Befunden keine Angaben zu Mastzellen gemacht. Diese sind in der Regel nur in der BAL zu finden.

Tabelle 9: Aktuelle Angaben der Labore zur Differentialzellzählung im TBS, %: Prozentangaben.

Labor	Makrophagen	Neutrophile Granulozyten	Lymphozyten	Eosinophile Granulozyten
1	semiquantitativ	semiquantitativ	semiquantitativ	semiquantitativ
2	semiquantitativ	semiquantitativ	semiquantitativ	semiquantitativ
3	%	%	%	%
4	%	%	%	%
5	semiquantitativ	semiquantitativ	semiquantitativ	semiquantitativ

Tabelle 10: Aktuelle Angaben der Labore zur Differentialzellzählung in der BAL, %: Prozentangaben.

Labor	Makrophagen	Neutrophile Granulozyten	Lymphozyten	Eosinophile Granulozyten	Mastzellen
1	semiquantitativ	semiquantitativ	semiquantitativ	semiquantitativ	semiquantitativ
2	semiquantitativ	semiquantitativ	semiquantitativ	semiquantitativ	semiquantitativ
3	%	%	%	%	%
4	%	%	%	%	%
5	%	%	%	%	%

Tabelle 11: Empfehlung einer einheitlichen Befundung zur Differentialzellzählung im TBS.

Labor	Makrophagen	Neutrophile Granulozyten	Lymphozyten	Eosinophile Granulozyten
1	semiquantitativ	semiquantitativ	semiquantitativ	semiquantitativ
2	semiquantitativ	semiquantitativ	semiquantitativ	semiquantitativ
3	semiquantitativ	semiquantitativ	semiquantitativ	semiquantitativ
4	semiquantitativ	semiquantitativ	semiquantitativ	semiquantitativ
5	semiquantitativ	semiquantitativ	semiquantitativ	semiquantitativ

Tabelle 12: Empfehlung einer einheitlichen Befundung zur Differentialzellzählung in der BAL, %: Prozentangaben.

Labor	Makrophagen	Neutrophile Granulozyten	Lymphozyten	Eosinophile Granulozyten	Mastzellen
1	%	%	%	%	%
2	%	%	%	%	%
3	%	%	%	%	%
4	%	%	%	%	%
5	%	%	%	%	%

Zunächst wurden die in der Literatur zu findenden Angaben zu Referenzwerten der Differenzialzellzählung lungengesunder Pferde zu beiden Probenarten zusammengestellt (s. Tab. 1 und 2). In den Tabellen enthalten sind ebenfalls Angaben der laborintern festgelegten physiologischen Referenzwerten für TBS und BAL von einem Labor der Studie und der Untersucher A und B der Klinik für Pferde.

Aus diesen Informationen im Zusammenspiel mit den Definitionen der genutzten semiquantitativen Begriffe wurde zunächst eine Referenztafel mit semiquantitativen Angaben und Prozentwerten zur physiologischen Verteilung der Zellarten bei lungengesunden Pferden erstellt (s. Tabelle 13).

Auf diese Weise sollte eine bessere Beurteilung der semiquantitativen Angaben ermöglicht und ein Verständnis für physiologische Ergebnisse der Differenzialzellzählung entwickelt werden. Dadurch sollen Abweichungen vom physiologischen Zellbild erkannt und eingeordnet werden können.

Tabelle 13: Physiologische Zellverteilung für TBS und BAL, gelb markierte Werte sind Referenzwerte aus dem Consensus Statement für IAD, die noch nicht eindeutig für mildes bis moderates equines Asthma sprechen, aber hinweisend sein können, grün markierter Wert ist eine Beobachtung aus der eigenen Studie, wobei Pferde mit diesen Werten als gesund eingestuft wurden.

	TBS	BAL
Zelldichte	geringgradig	geringgradig
Alveolar-makrophagen	mittelgradig, 30-70%	mittelgradig, 40-70%
Neutrophile Granulozyten	geringgradig, vereinzelt, <30%	vereinzelt, <5% geringgradig <10%
Lymphozyten	geringgradig, 10-35%, auch vereinzelt, <10%	mittelgradig, 25-50%
Eosinophile Granulozyten	vereinzelt, <1%	vereinzelt, <1% geringgradig <5%
Mastzellen	vereinzelt, <1%	vereinzelt, <2% geringgradig <5%

Anschließend wurden für die Zellen der Differentialzellzählung (Alveolarmakrophagen, neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, eosinophile Granulozyten, Mastzellen) die Anzahl der semiquantitativen Gradeinteilungen zum Vorkommen der Zellart am Gesamtzellbild festgelegt. Bei der Auswahl der Gradanzahl wurde sich an den Angaben der Labore orientiert und diese wurden zusammen mit den klinikinternen Einteilungen in ein einheitliches Schema gebracht. Dabei wurde bei den Zellarten, die den größten Anteil am Differenzialzellbild haben (Makrophagen, neutrophile Granulozyten, Lymphozyten), eine Aufteilung in fünf verschiedene Grade festgelegt (vereinzelt, geringgradig, mittelgradig, hochgradig, dominierend). Zellen, die weniger häufig im Differenzialzellbild vorkommen (Eosinophile Granulozyten und Mastzellen), können bei dem Schema in vier Gruppen eingeteilt werden.

Prozentuale Definitionen der semiquantitativen Begriffe für jede Zellart wurden mittels der Referenztable für die physiologische Zellverteilung, sowie durch die Orientierung an den Definitionen der Labore festgelegt. Dabei wurde das Probenmaterial TBS oder BAL, berücksichtigt.

Die physiologischen Referenzwerte wurden insoweit berücksichtigt bzw. involviert, dass es in dem Scoring System bei jeder Zellart die Möglichkeit gibt, einen semiquantitativen Begriff zusammen mit den dazugehörigen prozentualen Referenzwerten auszuwählen, um einen physiologischen Gehalt der Zellart auszudrücken. Somit werden Abweichungen der Befunde

vom physiologischen Zellbild eines gesunden Pferdes direkt erkannt und eingeordnet. Die physiologischen Werte wurden in der Tabelle 13 zusammengefasst.

Epithelzellen und der Mukusgehalt wurden ebenfalls semiquantitativ eingeteilt, ähnlich wie bei den laborinternen Befundungen. Da Curschmannspiralen, Bakterien, Fremdmaterial und eine Doppel-/oder Mehrkernigkeit der Alveolarmakrophagen eher ungleichmäßig vorhanden sein können, ihr Vorkommen aber wichtige Informationen zur Dauer oder Ursache der Erkrankung geben kann, wird in dem Scoring System ein Vorhandensein dokumentiert.

Das vereinheitlichte Scoring System ist in den Tabellen 14 und 15 dargestellt.

Um schlussendlich den interindividuellen Vergleich durchzuführen, wurden die Befundergebnisse aller Labore auf das vereinheitlichte Scoring System übertragen und eingeteilt. Durch die Übertragung der semiquantitativen Begriffe und Prozentzahlen in den Befundbogen wurden kategoriale (1-5) Daten für einen statistischen Vergleich erzeugt. Da alle semiquantitativen Begrifflichkeiten und Prozentwerte im Befundbogen eingearbeitet wurden, war ein Vergleich möglich.

Die Begriffsdefinitionen von Labor 1 stimmten zum Teil nicht mit denen der anderen Labore bzw. mit dem des vereinheitlichten Scoring Systems überein, sodass die Befunde dieses Labors immer der am besten passenden Begrifflichkeit oder Prozentangabe zugeordnet wurden. Außerdem wies dieses Labor eine hohe Anzahl an Gradeinteilungen für das Vorkommen einer Zellart auf, sodass zum Teil semiquantitative Angaben zusammengefasst werden mussten. So wurden im TBS eine Anzahl an „einigen“ (20-40%) und „zahlreichen“ (40-60%) Makrophagen der Angabe „mittelgradige Makrophagen“ (30-70%) zugeteilt. Bei der BAL wurde die Angabe „einige“ Makrophagen (20-40%) zu der Angabe „geringgradig“ (10-40%) hinzugefügt, da die prozentualen Definitionen besser übereinstimmten. Besonders bei den neutrophilen Granulozyten in der BAL gab es bei diesem Labor Differenzen zu den anderen Definitionen, sodass die Angabe von „wenigen neutrophilen Granulozyten“ (10-20%) dieses Labors im vereinheitlichten Scoring System dem Begriff „mittelgradig“ (10-25%) zugeteilt wurde, da die prozentualen Werte auf diese Weise am besten übereinstimmten. Auch die Angabe „einige neutrophilen Granulozyten“ (20-40%) dieses Labors wurde im Scoring System der Angabe „hochgradig“ (>25%) zugeteilt.

Viele Labore orientieren sich an den Referenzwerten des Consensus Statements der IAD zu neutrophilen Granulozyten, sodass eine logische Zuteilung der semiquantitativen Begriffe zu den entsprechenden Prozentwerten von großer Bedeutung für die Diagnosestellung ist.

Mithilfe des vereinheitlichten Scoring Systems konnte schließlich die interindividuelle Varianz zytologischer Ergebnisse zwischen Laboren überprüft werden.

Tabelle 14: Teil 1: Vereinheitlichtes Scoring System zur zytologischen Untersuchung von TBS und BAL.

Vereinheitlichtes Scoring System für TBS und BAL				
	TBS		BAL	
Zelldichte	1	geringgradig	1	geringgradig
	2	mittelgradig	2	mittelgradig
	3	hochgradig	3	hochgradig
Alveolar-makrophagen	1	ganz vereinzelt, vereinzelt Prozentangaben <10%	1	ganz vereinzelt, vereinzelt Prozentangaben <10%
	2	wenige, geringgradig Prozentangaben 10-30%	2	wenige, einige, geringgradig Prozentangaben 10-40%
	3	einige, zahlreich, mittelgradig Prozentangaben 30-70%	3	mittelgradig, zahlreich Prozentangaben 40-70%
	4	hochgradig, etliche Prozentangaben >70%	4	hochgradig, etliche Prozentangaben >70%
	5	dominierend, massenhaft Prozentangaben >90%	5	dominierend, massenhaft Prozentangaben >90%
Neutrophile Granulozyten	1	ganz vereinzelt, vereinzelt Prozentangaben <10%	1	ganz vereinzelt, vereinzelt Prozentangaben <5%
	2	wenige, geringgradig Prozentangaben 10-25%	2	geringgradig Prozentangaben <10%
	3	einige, mittelgradig Prozentangaben 25-45%	3	wenige, mittelgradig Prozentangaben 10-25%
	4	hochgradig, zahlreich Prozentangaben 45-70%	4	einige, zahlreich, hochgradig Prozentangaben 25-60%
	5	etliche, massenhaft, dominierend Prozentangaben >70%	5	etliche, massenhaft, dominierend Prozentangaben >60%
Lymphozyten	1	ganz vereinzelt, vereinzelt Prozentangaben <10%	1	ganz vereinzelt, vereinzelt Prozentangaben <10%
	2	wenige, geringgradig Prozentangaben 10-30%	2	wenige, geringgradig Prozentangaben 10-25%
	3	einige, mittelgradig Prozentangaben 30-50%	3	einige, mittelgradig Prozentangaben 25-50%
	4	hochgradig, zahlreich, etliche Prozentangaben über >50%	4	hochgradig, zahlreich, etliche Prozentangaben über >50%
	5	massenhaft, dominierend Prozentangaben >70%	5	massenhaft, dominierend Prozentangaben >70%

Tabelle 15: Teil 2: Vereinheitlichtes Scoring System zur zytologischen Untersuchung von TBS und BAL.

Vereinheitlichtes Scoring System für TBS und BAL				
	TBS		BAL	
Eosinophile Granulozyten	1	ganz vereinzelt, vereinzelt Prozentangaben <1%	1	ganz vereinzelt, vereinzelt Prozentangaben <1%
	2	wenige, geringgradig Prozentangaben 1-5%	2	wenige, geringgradig Prozentangaben 1-5%
	3	einige, mittelgradig Prozentangaben 5-10%	3	einige, mittelgradig Prozentangaben 5-10%
	4	hochgradig, zahlreich Prozentangaben >10%	4	hochgradig, zahlreich Prozentangaben >10%
Mastzellen	1	ganz vereinzelt, vereinzelt Prozentangaben <1%	1	ganz vereinzelt, vereinzelt Prozentangaben <2%
	2	wenige, geringgradig Prozentangaben 1-5%	2	wenige, geringgradig Prozentangaben 2-5%
	3	einige, mittelgradig Prozentangaben 5-10%	3	einige, mittelgradig Prozentangaben 5-10%
	4	hochgradig, zahlreich Prozentangaben >10%	4	hochgradig Prozentangaben >10%
Epithelzellen	1	vereinzelt, wenig, geringgradig Prozentangaben <10%	1	vereinzelt, wenig, geringgradig Prozentangaben <10%
	2	einige, mittelgradig Prozentangaben 10-30%	2	einige, mittelgradig Prozentangaben 10-20%
	3	zahlreich, häufig, hochgradig Prozentangaben >30%	3	zahlreich, häufig, hochgradig Prozentangaben >20%
Doppel-/Mehrkernigkeit	1	vorhanden	1	vorhanden
	0	nicht vorhanden	0	nicht vorhanden
Mucus	1	geringgradig	1	geringgradig
	2	mittelgradig	2	mittelgradig
	3	hochgradig	3	hochgradig
Curschman-spiralen	1	vorhanden	1	vorhanden
	0	nicht vorhanden	0	nicht vorhanden
Bakterien	1	intrazellulär	1	intrazellulär
	2	extrazellulär	2	extrazellulär
	3	intra- und extrazellulär	3	intra- und extrazellulär
Fremdmaterial	1	vorhanden	1	vorhanden
	0	nicht vorhanden	0	nicht vorhanden

4 Statistik

Die Reliabilitätsanalyse dient zur Überprüfung der Zuverlässigkeit und Beständigkeit einer Messung. Bei wiederholter Durchführung einer Methode sollen zuverlässige Ergebnisse erzielt und so eine Übereinstimmung und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse überprüft werden. In dieser Studie wird die Zuverlässigkeit der zytologischen Untersuchung von TBS und BAL analysiert. Dazu wurde die intra- und interrater Reliabilität überprüft, also die Übereinstimmung von Ergebnissen innerhalb und zwischen verschiedenen Beurteilern. Die vier Fremdlabore und zwei klinikinternen Untersucher stellen in dieser Studie die unterschiedlichen Beurteiler dar, welche „Rater“ genannt werden. Ein Labor stellt einen Rater dar, unabhängig davon, ob einem Labor verschiedene Beurteiler zur zytologischen Auswertung zur Verfügung standen.

Bei der intrarater Reliabilität geht es um die Übereinstimmung zytologischer Ergebnisse zweier Proben a und b des gleichen Pferdes beurteilt durch ein Labor bzw. Untersucher. Die interrater Reliabilität beurteilt die Übereinstimmung der Ergebnisse aller Labore bzw. Untersucher in Bezug auf ein Pferd.

Für die intrarater Reliabilität wurde die Varianz der Ergebnisse zu den Parametern, die in Kapitel 3.5.3. genannt wurden (z.B. Makrophagen, Lymphozyten, Zellzahl), innerhalb eines Labors bzw. Untersuchers überprüft. Durch die doppelt verblindete zytologische Untersuchung der Proben eines Pferdes ergaben sich für jeden der untersuchten Parameter zwei Ergebnisse für das gleiche Pferd durch das gleiche Labor/den gleichen Untersucher. Diese zwei Ergebnisse wurden als a und b gegenübergestellt, miteinander verglichen und so die Übereinstimmung der Ergebnisse für die einzelnen Parameter berechnet. Die Prozentangaben zu den Parametern wurden als metrische Daten genutzt, die semiquantitativen Angaben wurden in ordinale und nominale (kategoriale) Daten anhand der Gradeinteilungen der semiquantitativen Begriffe der einzelnen Labore (s. dazu Tab. 4 und 5 im Anhang) umgewandelt. So wurde für jeden Parameter und für alle vier Fremdlabore und die zwei Untersucher der Klinik ein statistisches Maß für die intrarater Reliabilität berechnet und ein Wert der Übereinstimmung erzielt.

Der ICC wird als statistisches Maß berechnet, um unter anderem die Übereinstimmung von zwei Beurteilungen eines Raters zu vergleichen. Hier wurden die zwei Beurteilungen eines Pferdes durch ein Labor/Untersucher (Beurteiler/Rater) verglichen. In dieser Studie wurde der ICC für metrische (intervallskalierte) Daten berechnet (Prozentwerte). Der ICC kann Werte zwischen -1 und +1 annehmen, wobei Werte von $<0,5$ nach Koo und Li eine schlechte Übereinstimmung, 0,5-0,75 eine faire/moderate, 0,75-0,9 eine gute und Werte ab 0,9 eine exzellente Übereinstimmung der Ergebnisse bedeuten (Koo und Li 2016). Ein Wert von 0 gibt keine Übereinstimmung der Werte an. Wenn die Varianz zwischen den Beurteilungen eines Untersuchers/Raters gering ist, ist der ICC dementsprechend hoch.

Für nominal- und ordinalskalierte (kategoriale) Daten sind Cohens Kappa und das gewichtete Cohens-Kappa berechnet worden. Auch sie werden zur Quantifizierung der Übereinstimmung von Beurteilungen zweier Untersucher oder für zwei Beurteilungen eines Untersuchers verwendet. Beide wurden hier als statistische Maße für die intrarater Reliabilität berechnet. Das Cohens Kappa wurde für nominalskalierte Daten und das gewichtete Cohens-Kappa für ordinalskalierte Daten (semiquantitative Angaben) berechnet. Das gewichtete Cohens-Kappa bietet den Vorteil, dass die Größe des Unterschieds zwischen zwei Werten berücksichtigt wird. Bei der Berechnung des gewichteten Cohens-Kappas für nominalskalierte Daten konnten identische Ergebnisse zum Cohens Kappa erzielt werden, sodass schließlich nur das gewichtete Kappa zur Beurteilung nominal- und ordinalskalierten Daten verwendet wurde, um ebenfalls ein 95%iges Konfidenzintervall zu erhalten, welches nur beim gewichteten Cohens-Kappa angegeben wird. Ausschließlich für den Parameter Bakterien wurde das Cohens Kappa berechnet, da das Statistikprogramm diesen Parameter mit dem gewichteten Cohens-Kappa nicht berechnen konnte.

In der Kappa Statistik werden durch Landis und Koch Vorschläge zur Interpretation der Messgrößen gegeben. So gibt ein Wert von 0 keine, 0,21-0,4 eine faire/schlechte, 0,41-0,6 eine moderate, 0,61-0,8 eine substanzielle/gute und über 0,81 eine fast perfekte Übereinstimmung an (Landis und Koch 1977).

Für die Vergleichsanalyse zwischen den Laboren und Untersuchern wurden die Ergebnisse aller Labore in das vereinheitliche Scoring System übertragen und so in nominal und ordinalskalierte (kategoriale) Daten umgewandelt (s. Kap. 3.6.). Alle 30 imaginären Pferde (15 ursprüngliche Pferde) erhielten für jeden Parameter z.B. Makrophagen 6 Ergebnisse durch 4 Labore und 2 Untersucher. Diese 6 Ergebnisse der 30 Pferde wurden für jeden Parameter gegenübergestellt und miteinander verglichen. Für jeden Parameter wurde Krippendorff's α berechnet und ein Wert für die Übereinstimmung erzielt. Krippendorff's α ist ebenfalls ein statistisches Maß zur Überprüfung des Ausmaßes der Übereinstimmung von Beobachtungen zwischen mehreren Beurteilern (interrater Reliabilität). Es bietet den Vorteil, dass es für eine beliebige Anzahl an Ratern, Ausprägungen sowie ordinale, nominale und metrische Daten verwendet werden kann. Außerdem wird es nicht durch fehlende Werte beeinflusst (Hayes und Krippendorff 2007).

Krippendorff's α gibt für das Maß der Übereinstimmung einen Wert zwischen 0 und 1 an, wobei erst ein Wert ab 0,8 als eine gute Übereinstimmung anzusehen ist. Ein Wert von 1 gibt eine perfekte Übereinstimmung und ein Wert von 0 keine Übereinstimmung an. Werte ab 0,67 sind vorsichtig interpretierbar (tentative conclusions) (Krippendorff 2004). Zur Berechnung der Konfidenzintervalle wurde das Bootstrap-Verfahren verwendet.

Beim ICC, gewichteten Cohens-Kappa und Krippendorff's α kommt es darüber hinaus zur Angabe eines 95%-Konfidenzintervalls. Dabei gibt ein breites Konfidenzintervall eine ungenaue Schätzung der Übereinstimmung an. Das Ausmaß der Übereinstimmung könnte somit auch einen anderen Wert annehmen. Die Konfidenzintervalle hängen von der Varianz der Ergebnisse und der Stichprobengröße ab. Wenn die Varianz groß ist, ist auch das Konfidenzintervall breit und man benötigt eine große Stichprobe, um ein kleines Konfidenzintervall und somit eine genauere Schätzung der Übereinstimmung zu erhalten.

Die statistischen Berechnungen erfolgten bei allen Parametern für TBS und BAL getrennt.

Alle statistischen Maße für die inter- und intrarater Reliabilität wurden mit IBM SPSS Statistics berechnet.

5 Ergebnisse

5.1 Ergebnisse der Atemwegsuntersuchungen und Diagnosestellung in der Klinik für Pferde

In der Tabelle 1 im Anhang sind das Signalement und die Befunde der klinischen Untersuchung der Studienpferde mithilfe eines Punkteschemas zur vereinfachten Darstellung aufgeführt. In Tabelle 2 im Anhang sind die Ergebnisse der arteriellen Blutgasanalyse, der endoskopischen Untersuchung, der Leukozyten und des SAAs der Studienpferde dargestellt. Die Befunde der mikrobiologischen Untersuchung der Studienpferde sind in Tabelle 3 und die Befunde der zytologischen Untersuchung in den Tabellen 6-8 im Anhang aufgeführt. Die Befunde aller Untersuchungen wurden in das Scoring System von Barton und Gehlen 2022 übertragen (s. Kap. 3.4.). Auf diese Weise wurden in dieser Studie fünf Pferde als gesund (Gruppe 1), fünf Pferde als geringgradig oder mittelgradig erkrankt (MEA: Gruppe 2) und fünf Pferde als hochgradig erkrankt (SEA: Gruppe 3) eingestuft.

In Tabelle 16 ist die Punkteverteilung der Studienpferde nach dem Scoring System sowie die Einteilung der 15 Pferde in 3 Gruppen angegeben.

5.1.1 Lungengesunde Pferde

Die an der Studie beteiligten fünf lungengesunden Pferde zeigten keine klinischen respiratorischen Symptome und wiesen in der Differentialzellzählung, die im Rahmen der Atemwegsuntersuchung stattfand, <5% neutrophile Granulozyten auf. Auch bei der Endoskopie der Atemwege und der arteriellen Blutgasanalyse wurden keine Auffälligkeiten bemerkt. Nach dem Scoring System von Barton und Gehlen wurden für alle Pferde 0 bis 1 Punkte vergeben, was in der Diagnosestellung gesund resultierte.

5.1.2 Pferde mit mildem bis moderatem equinem Asthma

Fünf der in der Studie beteiligten Pferde erhielten die Diagnose MEA im Rahmen der Atemwegsuntersuchung. Eines dieser Pferde (Pferd 6) erhielt die Diagnose equines Asthma in Remission aufgrund der Verbesserung der klinischen und zytologischen Befunde. Alle Pferde erreichten 2-6 Punkte im Scoring System nach Barton und Gehlen, was eine gering- und mittelgradige Erkrankung widerspiegelte. Die klinischen Symptome dieser Gruppe fielen eher mild aus. Bei zwei Pferden kam spontaner oder auslösbarer Husten vor, zwei Pferde zeigten eine abdominal betonte Atmung und ein weiteres Pferd wies ein deutlich vergrößertes

Lungenfeld auf. Bei der Differentialzellzählung der BAL, die im Rahmen der Lungenuntersuchung in der Klinik stattfand, konnten bei dem Pferd mit equinem Asthma in Remission neutrophile Granulozyten nur mit einem Anteil von 2% nachgewiesen werden. Die anderen Pferde wiesen allerdings knapp über 25% an neutrophilen Granulozyten in der BAL auf (s. Tab. 2 im Anhang). Pferd 11 zeigte keine klinischen Symptome abgesehen von vorberichtlich dokumentiertem Husten. Allerdings wies dieses Pferd in der Endoskopie erhöhte Mengen an viskösem Trachealsekret und eine deutlich erhöhte Anzahl neutrophiler Granulozyten in der BAL auf, sodass hier bei einer rein zytologischen Diagnose der Verdacht auf SEA bestehen würde. In Zusammenhang mit allen weiteren Befunden wurde für dieses Pferd dennoch die Diagnose MEA gestellt.

5.1.3 Pferde mit schwerem equinem Asthma

Fünf Pferde erhielten die Diagnose SEA, allerdings zeigten nur 3 Pferde eine Ruhedyspnoe und eine erhöhte Atemfrequenz. Drei der fünf Pferde zeigten spontanen oder auslösbaren Husten und zwei Pferde wiesen ein deutlich vergrößertes Lungenfeld auf. Pferd 15 zeigte einen deutlichen Atemaufwand in Ruhe in Form einer Bauchpresse und wies deutliche auskultatorische Befunde in Form von Giemen und Rasseln auf. Zwei Pferde wiesen einen verminderten Sauerstoffpartialdruck und somit eine Hypoxie und eine respiratorische Partialinsuffizienz auf. Zwei weitere Pferde wiesen einen verminderten Sauerstoffpartialdruck und einen erhöhten Dioxidpartialdruck auf, was eine respiratorische Globalinsuffizienz widerspiegelte. In der Endoskopie konnten bei allen Pferden deutlich erhöhte Mengen sowie eine erhöhte Viskosität des Trachealsekretes dargestellt werden. Ebenso wurde bei allen Pferden in der Differentialzellzählung ein Anteil von mehr als 25% neutrophile Granulozyten im Rahmen der Lungenuntersuchung ausgezählt. Die Pferde erhielten 7 bis 12 Punkte im Scoring System zur Diagnosestellung und wurden so als hochgradig erkrankt eingestuft.

Kein mikrobiologisches Ergebnis gab Hinweise auf eine bakterielle Infektion des Atmungstraktes der Pferde. Der Keimgehalt bei Pferd 15 wurde als Störung der mukoziliären Clearance gewertet (s. Tab. 3 im Anhang).

Durch die Beurteilung der klinischen, endoskopischen und zytologischen Befunde sowie der Blutanalysen konnte in der Klinik für Pferde eine valide Diagnose für alle Studienpferde gestellt werden. Diese Beurteilung stellt wie bereits erwähnt den Goldstandard zur Diagnosestellung von equinem Asthma dar, weswegen die Diagnosen aus der Klinik für Pferde als Referenz und als „richtige“ Diagnosen im Folgenden für die Studie genutzt wurden. Nach dem Abschluss der Atemwegsuntersuchung und Einteilung der Studienpferde in verschiedene Gruppen sollen im Folgenden die zytologischen Befunde zum gleichen Pferd innerhalb und zwischen den Fremdlaboren und der Klinik für Pferde verglichen werden.

Tabelle 16: Ergebnisse der Befunde aller Studienpferde beurteilt durch das Scoring System von Barton und Gehlen 2022.

Pferd	Husten- auslösung	Ruhe- dyspnoe	Lungen- perkussion	Lungen- auskultation	Endoskopie	Balf Zytologie	Blutgas- analyse	Score insgesamt	Gruppe
1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2	0	0	0	0	0	0	0	0	1
3	0	0	0	0	0	0	1	1	1
4	0	0	0	0	0	0	0	0	1
5	0	0	0	0	0	0	0	0	1
6	0	1	1	0	0	0	0	2	2
7	0	1	0	0	0	3	0	4	2
8	1	0	2	0	0	3	0	6	2
9	1	0	0	0	0	3	1	5	2
10	1	0	0	0	2	2	2	7	3
11	0	0	0	0	2	3	0	5	2
12	1	1	0	0	2	3	2	9	3
13	0	0	1	0	2	3	2	8	3
14	1	1	1	0	2	3	1	9	3
15	0	3	0	2	2	3	2	12	3

5.2 Ergebnisse der Untersuchungsbefunde der Labore

4 Fremdlabore und zwei Untersucher der Klinik für Pferde (Labor 5) führten zytologische Untersuchungen zu den Proben von 30 Pferden durch. Pro Pferd wurden ein TBS- und ein BAL-Ausstrich beurteilt. Alle Labore gaben die Ergebnisse der zytologischen Befundung des TBS und der BAL in einer ähnlichen Art und Weise an. Die Untersuchungsbefunde der Fremdlabore waren meist aufgeteilt in TBS und BAL, zum Teil allerdings auch als ein Befund angegeben, wenn beide Proben gleiche Zellverteilungen aufwiesen bzw. gleich beurteilt wurden. Dabei wurde zunächst die Zelldichte sowie das Vorkommen muköser Substanzen dokumentiert. Anschließend ist auf die vorkommenden Zellarten, deren Anteil am Gesamtzellbild sowie die Funktionszustände mancher Zellen eingegangen worden. Die Differentialzellzählung erfolgte wie bereits erwähnt semiquantitativ oder prozentual für Alveolarmakrophagen, neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, eosinophile Granulozyten und Mastzellen. Das Vorkommen von Epithelzellen wurde außer bei einem Labor semiquantitativ unabhängig von der Differentialzellzählung angegeben. Weitere beurteilte Parameter wurden in Kapitel 3.5.3. aufgeführt.

Anschließend kam es immer zu einer Befundinterpretation mit Angabe einer zytologischen Diagnose. Bei einigen Ergebnissen wurde keine eindeutige Diagnose geäußert.

Der Funktionszustand der Makrophagen und neutrophilen Granulozyten wurde ebenfalls bei einigen Proben und Laboren beurteilt. Bei den Makrophagen wurden die Phagozytose, schaumiges Aussehen und eine Mehrkernigkeit erwähnt. Bei den neutrophilen Granulozyten wurden eine Hypersegmentierung oder degenerative Zustände vermerkt. Zum Teil ist auch auf den morphologischen Zustand von Epithelzellen eingegangen worden.

Bei Labor 4 bestand das Ergebnis aus nur einer Befundung von TBS oder BAL. Auf Nachfrage wurde angegeben, dass immer der zellreichere Ausstrich beurteilt wird. Außerdem hat dieses Labor keine Angaben zur Doppel- oder Mehrkernigkeit, Curschmannspiralen oder Fremdmaterial gemacht. Darüber hinaus wurden hier die Epithelzellen in die Differentialzellzählung mit aufgenommen. Angaben zu schleimhaltigen Substanzen wurden in Prozenten angegeben.

Zusammengefasst wurden bei der Befundinterpretation aller Labore die vorkommenden Zellarten und deren Gehalt am Gesamtzellbild diskutiert. Der Funktionszustand der Zellen war ebenfalls von Bedeutung. So konnte zum Beispiel eine erhöhte Phagozytose von Fremdmaterial auch in Zusammenhang mit extrazellulären Bakterien Hinweise auf eine gestörte Clearance oder eine belastete Umwelt geben. Vermutungen zum Grad (geringgradig, mittelgradig, hochgradig), der Art (z.B. purulent, gemischtzellig, granulomatös) und zur möglichen Dauer (akut, subakut, chronisch) der Entzündung wurden geäußert. Zum Teil wurden Vermutungen zur Krankheitsursache geäußert sowie Therapieansätze vorgeschlagen.

Insgesamt wurden diese Befundinformationen nicht immer bei allen Laboren vollständig angegeben.

Außerdem wurde bei allen Laboren darauf hingewiesen, die zytologischen Befunde immer in Zusammenhang mit den klinischen Befunden, einer möglichen bereits stattgefundenen Therapie (z.B. Sekretolytika) sowie den Ergebnissen der mikrobiologischen Untersuchung zu sehen. In den Befundinterpretationen ist selten auf den Vorbericht eingegangen worden. Schließlich wurden zytologische Diagnosen angegeben, die zum Teil variierten.

Bei drei Fremdlaboren erfolgte die Analyse der eingesandten Proben durch verschiedene Untersucher. Bei einem Fremdlabor und bei der klinikinternen Beurteilung wurden die Proben von jeweils einem Untersucher beurteilt. Bei den Untersuchern der Fremdlabore handelte es sich um Tierärzte, Fachtierärzte der Pathologie, Fachtierärzte der Laboriumsdiagnostik oder Diplomates des European oder American College of Veterinary Clinical Pathology. Die interne Beurteilung erfolgte durch einen Resident sowie eine Dipolmate des European College of Equine Internal Medicine.

5.3 Ergebnis der intraindividuellen Varianz

Im Anschluss an die Atemwegsuntersuchungen und die Diagnosestellungen in der Klinik für Pferde sollte die Reproduzierbarkeit und Übereinstimmung zytologischer Ergebnisse zweier Proben a und b des gleichen Pferdes beurteilt durch ein Labor bzw. einen Untersucher überprüft werden. Im Rahmen dieser Studie sollte auch die Zuverlässigkeit der zytologischen Untersuchung innerhalb der Klinik für Pferde (in dieser Studie Labor 5) durch zwei erfahrene Untersucher (A und B) überprüft werden.

In den folgenden Ergebnisdarstellungen werden zu allen Untersuchern und Fremdlaboren zunächst die Ergebnisse der Proben a und b zu den wichtigsten Zellarten vorgestellt und anschließend das statistisch berechnete Maß der Übereinstimmung für ebenfalls die wichtigsten Zellarten graphisch dargestellt. Aufgrund der klinischen Relevanz werden vor allem die Ergebnisse zu den Makrophagen und neutrophilen Granulozyten sowie zu einzelnen anderen Parametern dargestellt. Auch die graphische Darstellung zur Übereinstimmung der Ergebnisse erfolgt aufgrund der klinischen Relevanz nur für die Zellarten, die an der Differentialzellzählung beteiligt sind. Werden Zellarten in den Graphen nicht dargestellt, konnten die Ergebnisse entweder nicht ausgewertet werden oder es lagen keine Angaben zu diesen Zellarten in den Befunden vor.

5.3.1 Ergebnis der intraindividuellen Varianz in der Klinik für Pferde

Bei der zytologischen Befundung des TBS wurden durch beide Untersucher in der Klinik für Pferde semiquantitative Angaben zur Differentialzellzählung gemacht. Hier wurde als Maß der Übereinstimmung der Ergebnisse zu allen Zellarten das gewichtete Cohens-Kappa berechnet. In der BAL gaben beide Untersucher Prozentangaben zur Differentialzellzählung an und das ICC wurde daraufhin als Maß der Übereinstimmung der Ergebnisse berechnet.

Zur Beurteilung des ICCs und des gewichteten Kappas wurde sich an den in der Literatur empfohlenen Einteilungen der Werte zur Interpretation orientiert. Wie beschrieben werden die Werte des ICCs und des gewichteten Kappas unterschiedlich interpretiert, da es zwei unterschiedliche statistische Maße sind (s. Kap. 4).

Da die genauen Prozentwerte aus der Befundung zur BAL der Untersucher A und B und auch von einigen Fremdlabore für den statistischen Vergleich verwendet werden sollten, war es notwendig verschiedene statistische Maße zu berechnen. Dies muss im Folgenden bei der Interpretation der Darstellungen beachtet werden.

In den nachfolgenden Abbildungen 8 und 9 sind die Ergebnisse der zytologischen Untersuchung von Untersucher A zu neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in der BAL dargestellt. Bei den Abbildungen ist zu beachten, dass Pferd 11 nicht durch Untersucher A beurteilt wurde. In den Abbildungen sind die Ergebnisse der Proben a und b des gleichen Pferdes nebeneinander als Säulendiagramme aufgetragen, sodass direkt die Varianz der Ergebnisse abgelesen werden kann. Ist kein Säulendiagramm in den Abbildungen zu sehen, kam die Zellart in der Probe nicht vor. Es ist zu erkennen, dass eine gute Übereinstimmung der Prozentwerte zu diesen Zellarten in der BAL vorliegt.

Ergebnisse

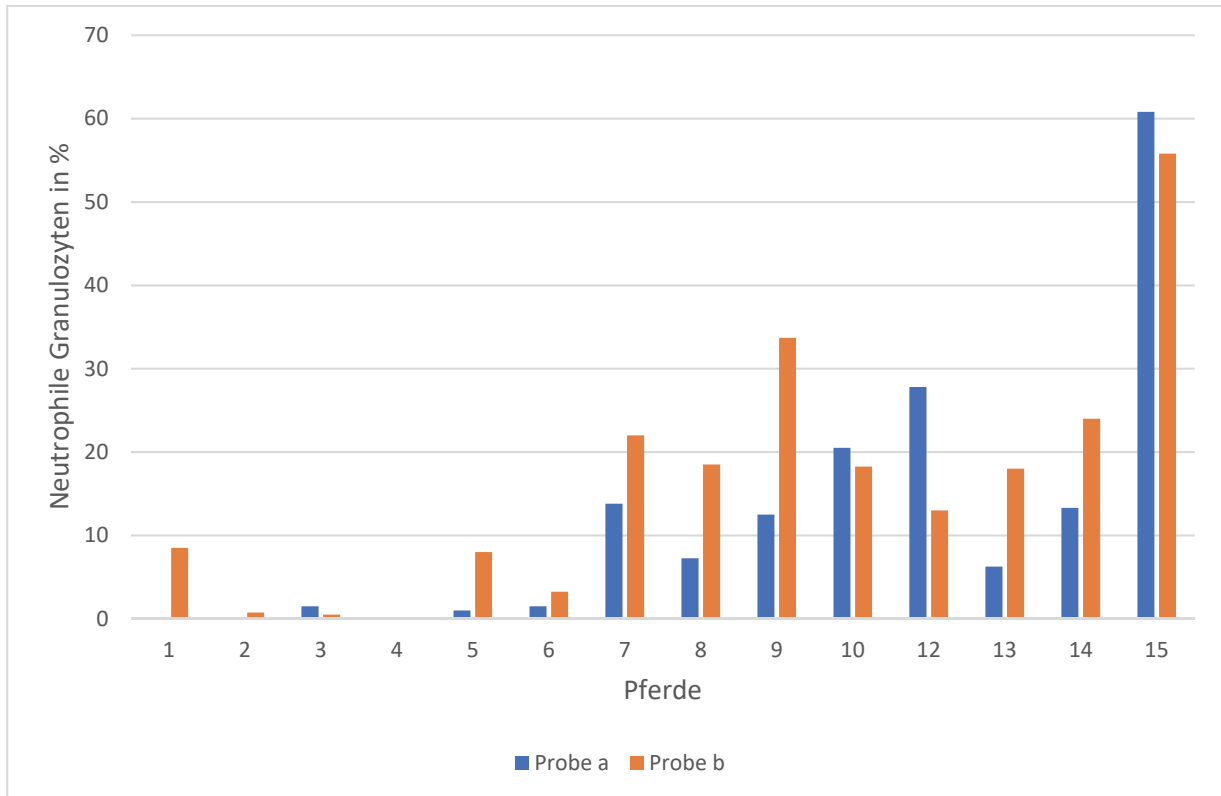


Abbildung 8: Intraindividuelle Varianz: Ergebnisse zu neutrophilen Granulozyten in der BAL von Labor 5 Untersucher A zu allen 15 Pferden.

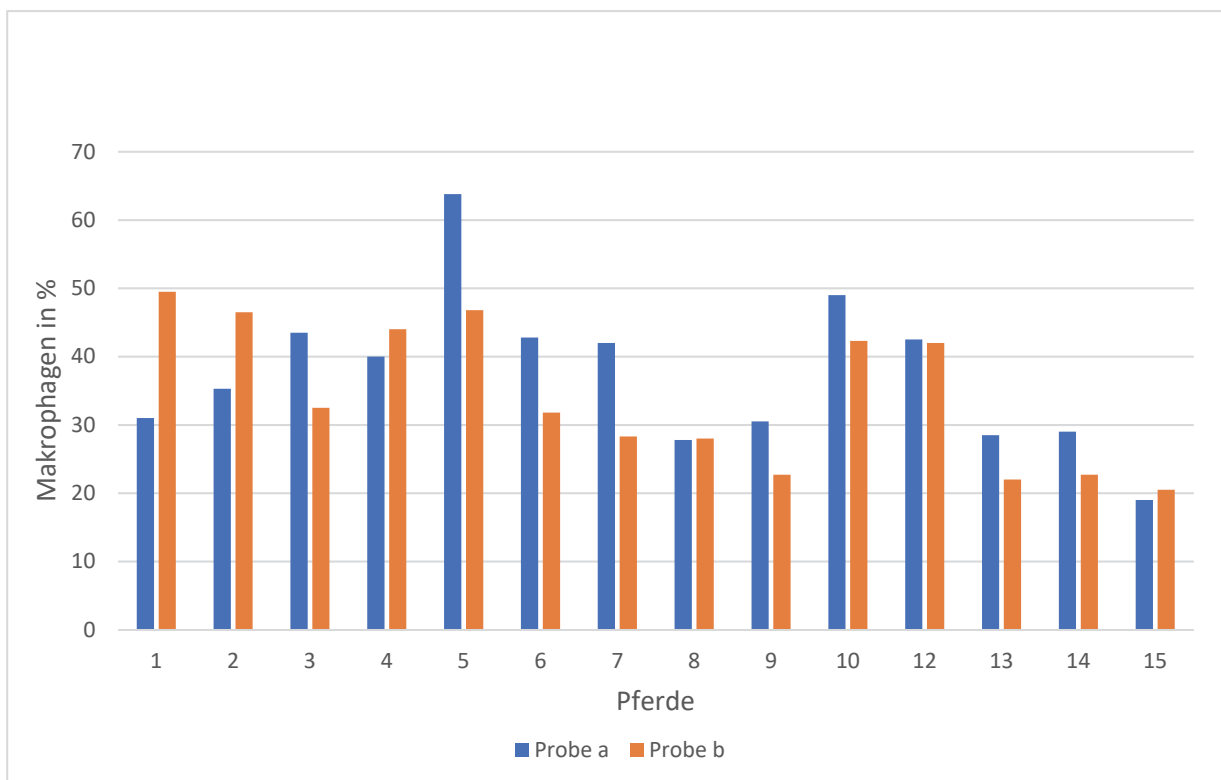


Abbildung 9: Intraindividuelle Varianz: Ergebnisse zu Makrophagen in der BAL von Labor 5 Untersucher A zu allen 15 Pferden.

Bei der zytologischen Auswertung zweier Proben a und b des gleichen Pferdes erreichte Untersucher A der Klinik für Pferde eine exzellente Übereinstimmung ($ICC > 0,9$) der Ergebnisse zu neutrophilen Granulozyten, eosinophilen Granulozyten und knapp zu Mastzellen in der BAL (s. Abb. 10). Die Ergebnisse dieser Zellarten variierten somit kaum. Eine noch knapp gute Übereinstimmung ($ICC 0,75$) erreichte Untersucher A bei den Makrophagen in der BAL. Die Ergebnisse der Proben a und b zu den Lymphozyten in der BAL variierten mehr, sodass nur eine moderate Übereinstimmung der Ergebnisse erzielt wurde ($ICC: 0,715$). Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 nachzuvollziehen.

Bei der intraindividuellen Übereinstimmung der Ergebnisse der Proben a und b des TBS erreichte Untersucher A dagegen nur bei den neutrophilen Granulozyten eine gute Übereinstimmung (gewichtetes Kappa $> 0,6$) (s. Abb. 11). Die Übereinstimmung der Ergebnisse zu allen weiteren Zellarten der Differentialzellzählung war moderat oder schlecht. Untersucher A erreichte bei den Ergebnissen zu allen weiteren Parametern (z.B. Mukus, Curschmannspiralen, Epithelzellen), die bei der zytologischen Untersuchung beurteilt wurden, nur eine schlechte Übereinstimmung und somit eine große Varianz der Ergebnisse. Allein die Ergebnisse zur Zellzahl in der BAL zeigten eine gute Übereinstimmung. Diese Ergebnisse sind im Anhang in den Tabellen 9-24 dargestellt.

In den folgenden Darstellungen zur Übereinstimmung der Ergebnisse ist immer das jeweilig berechnete statistische Maß der Übereinstimmung (ICC oder gewichtetes Kappa) und das dazugehörige 95%-Konfidenzintervall dargestellt. Eine grüne Linie markiert in der Darstellung ab wann eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse gegeben ist. Der ICC gibt ab einem Wert von $0,75$ eine gute Übereinstimmung an und das gewichtete Kappa gibt bereits ab $0,6$ eine gute Übereinstimmung an. Bei einigen Ergebnissen stellt sich im Folgenden das Konfidenzintervall breit dar, was auf eine ungenaue Schätzung der Übereinstimmung schließen lässt. Dies beruht auf einer großen Varianz der Ergebnisse und einer kleinen Studiengröße. Ein kleines Konfidenzintervall gibt dementsprechend eine genaue Schätzung der Übereinstimmung und eine geringe Varianz der Ergebnisse an.

Ergebnisse

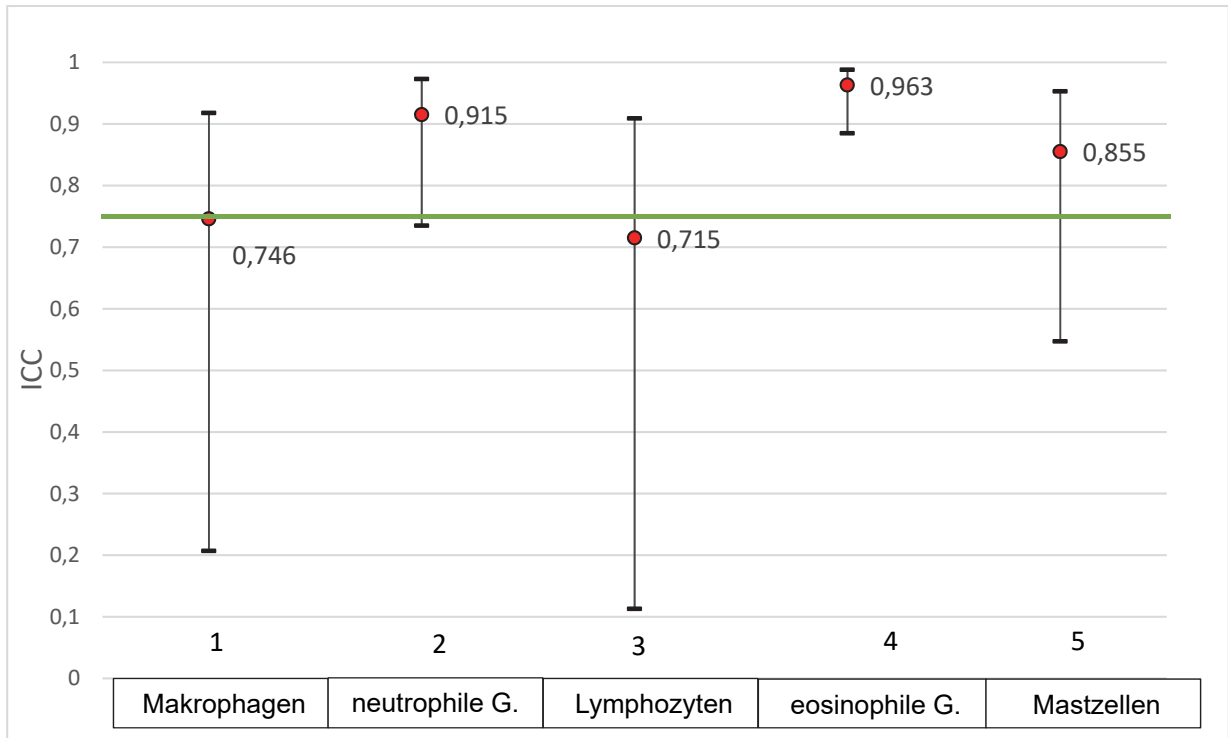


Abbildung 10: Intraindividuelle Übereinstimmung der Ergebnisse von Untersucher A zu verschiedenen Parametern in der BAL, roter Punkt stellt den ICC dar, zusätzlich ist das 95% Konfidenzintervall angegeben, Werte oberhalb der grünen Linie geben eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse an, große Konfidenzintervalle stellen eine große Varianz der Ergebnisse dar.

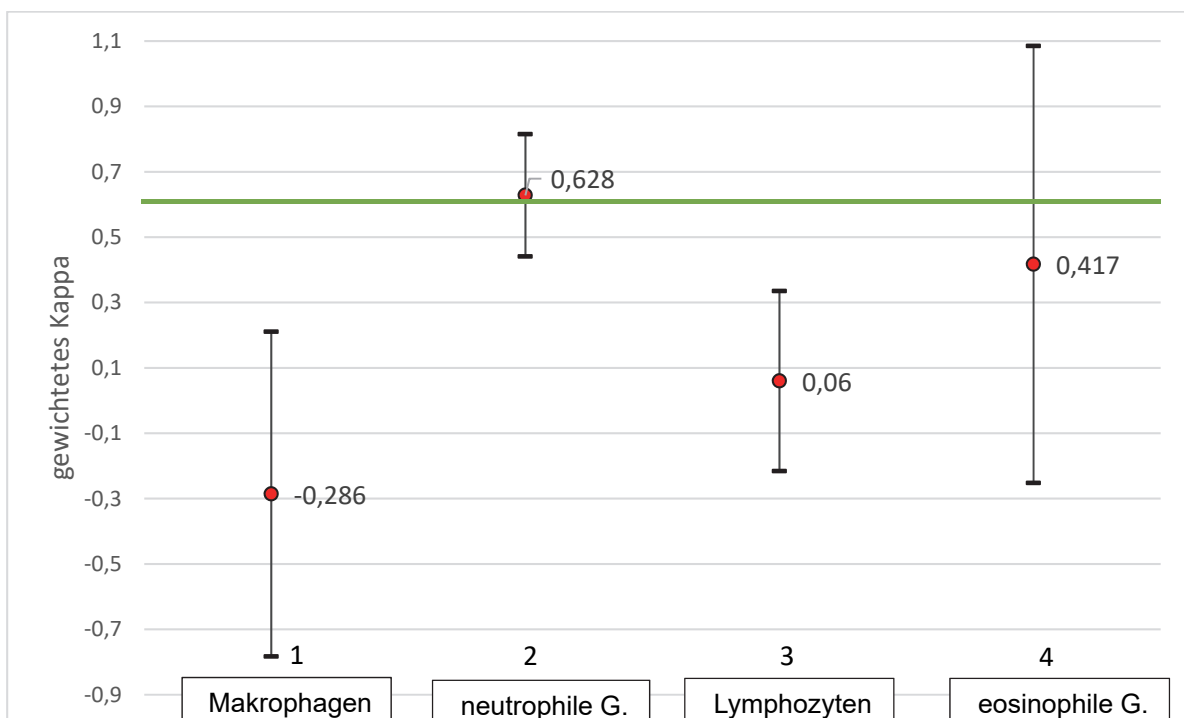


Abbildung 11: Intraindividuelle Übereinstimmung der Ergebnisse von Untersucher A zu verschiedenen Parametern im TBS, roter Punkt stellt das gewichtete Kappa dar, zusätzlich ist das 95% Konfidenzintervall angegeben, Erklärung s. Abb. 10.

Ein weiterer Untersucher (Untersucher B) der Klinik für Pferde beurteilte die Proben a und b der 15 Studienpferde. In den Abbildungen 12 und 13 sind die Ergebnisse der Proben a und b von Untersucher B zu neutrophilen Granulozyten und eosinophilen Granulozyten in der BAL dargestellt. Es fällt auf, dass bei den neutrophilen Granulozyten nur eine geringe Varianz der Ergebnisse vorliegt. Die Ergebnisse der Proben a und b zu den eosinophilen Granulozyten variieren dagegen stärker, was sich auch in der nur moderaten Übereinstimmung der Ergebnisse von Untersucher B zu den eosinophilen Granulozyten widerspiegelt (ICC: 0,62). In den Abbildungen 14 und 15 sind beispielhaft die Ergebnisse der Curschmannspiralen und der Makrophagen im TBS von allen 15 Pferden dargestellt. Es kann beobachtet werden, dass die Varianz der Ergebnisse zwischen den Proben a und b der Makrophagen gering und die der Curschmannspiralen hoch ist.

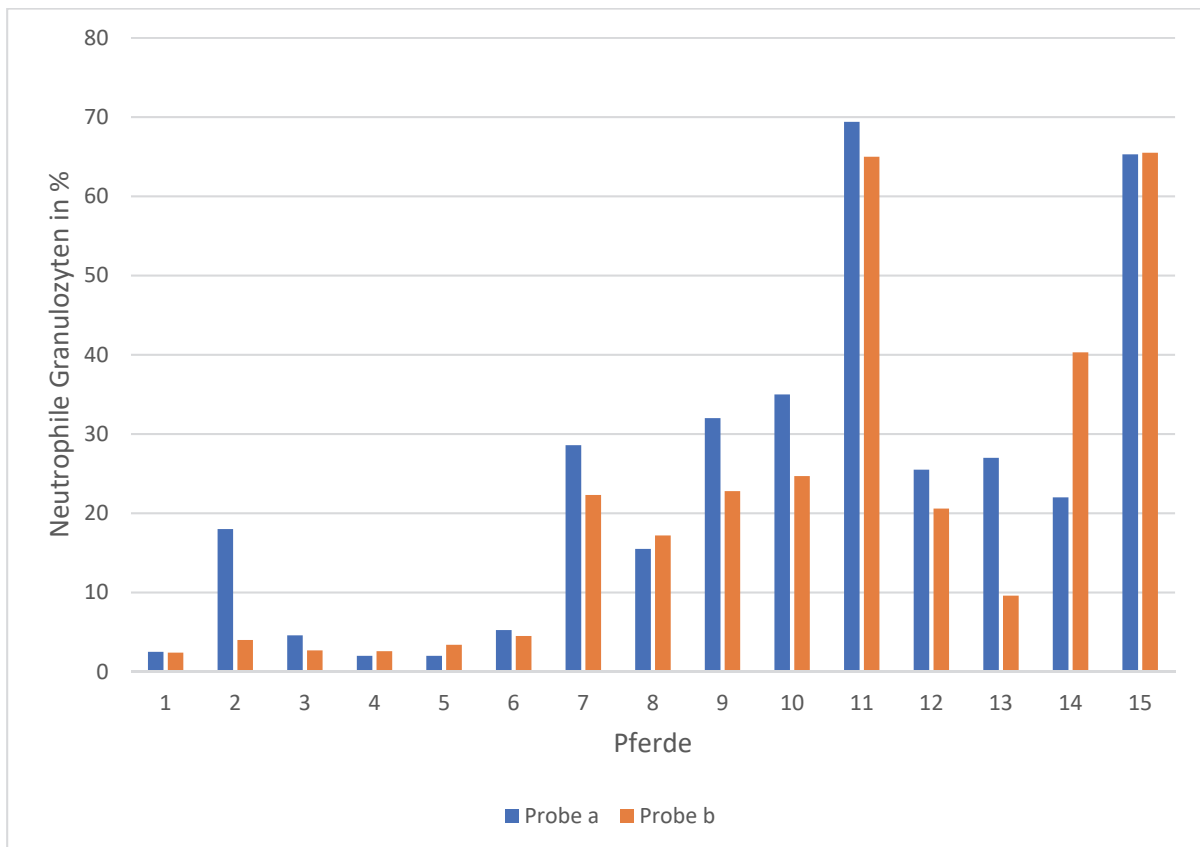


Abbildung 12: Intraindividuelle Varianz: Ergebnisse zu neutrophilen Granulozyten in der BAL von Labor 5 Untersucher B zu allen 15 Pferden.

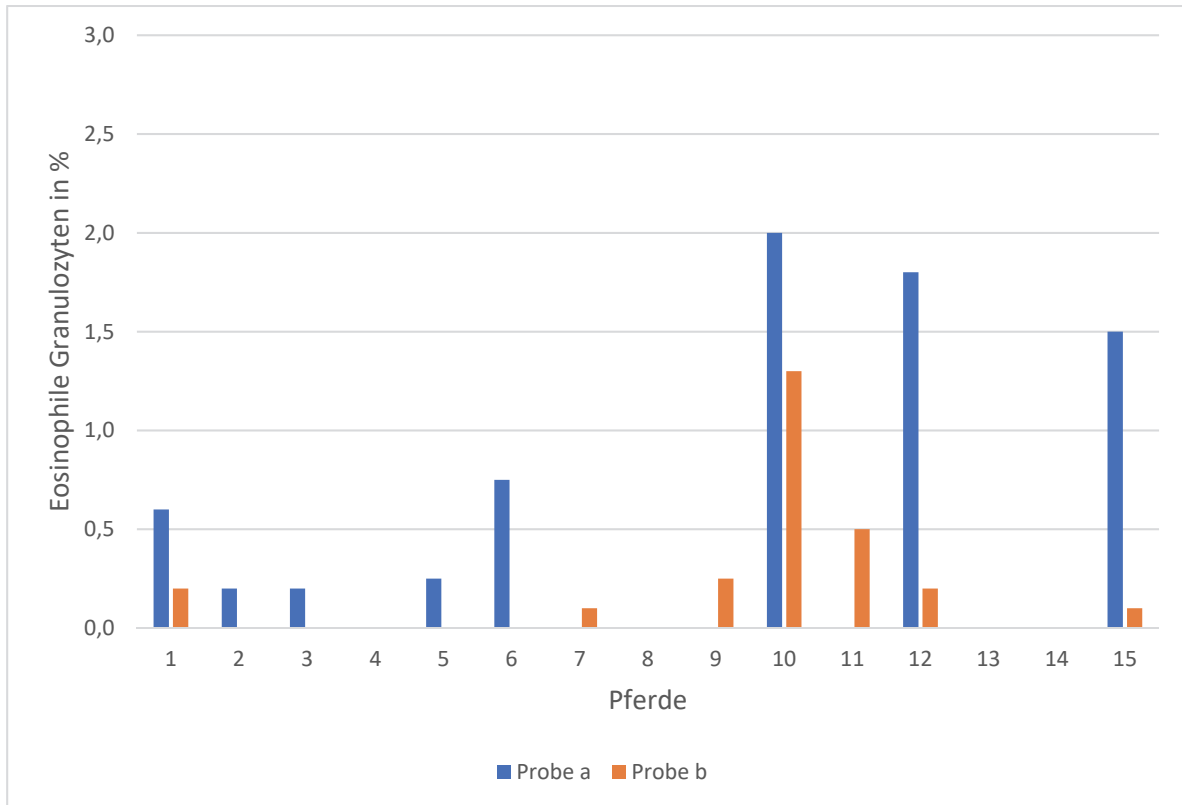


Abbildung 13: Intraindividuelle Varianz: Ergebnisse zu eosinophilen Granulozyten in der BAL von Labor 5 Untersucher B zu allen 15 Pferden.

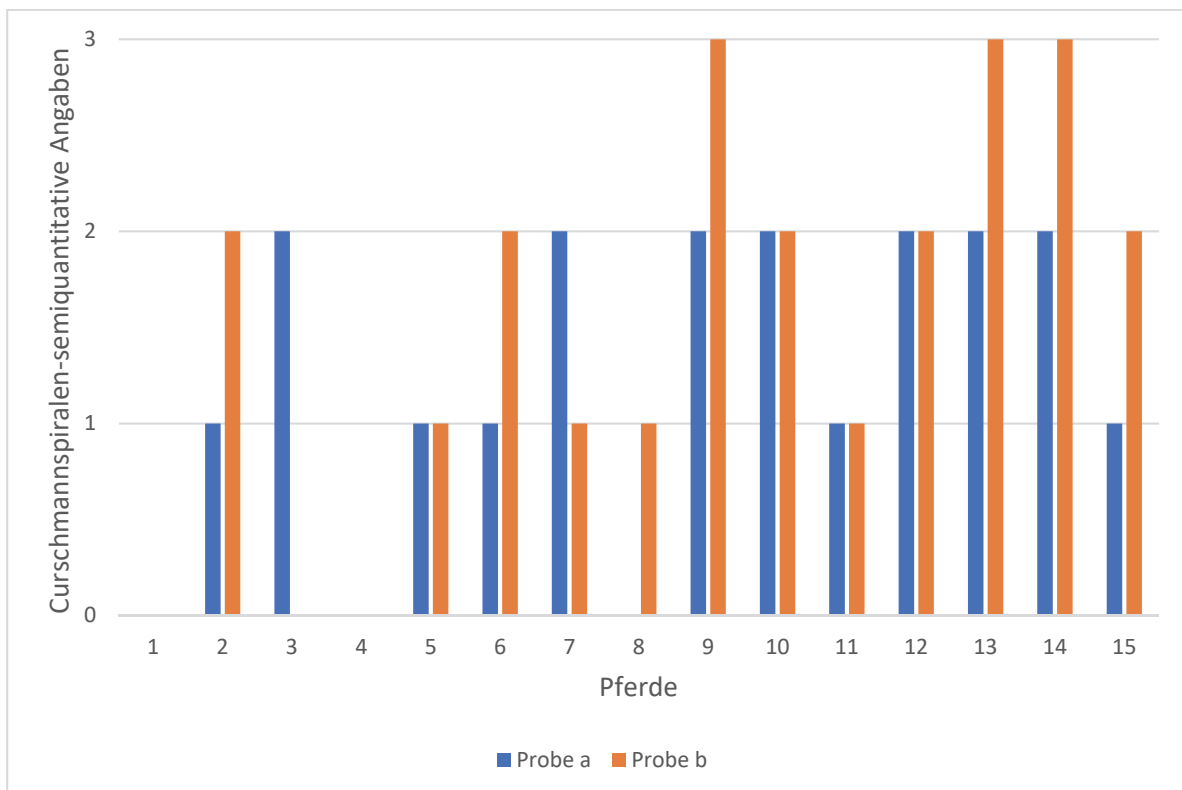


Abbildung 14: Intraindividuelle Varianz: Ergebnisse zu Curschmannspiralen im TBS von Labor 5 Untersucher B zu allen 15 Pferden, semiquantitative Angaben beruhen auf den Befundbögen von Labor 5.

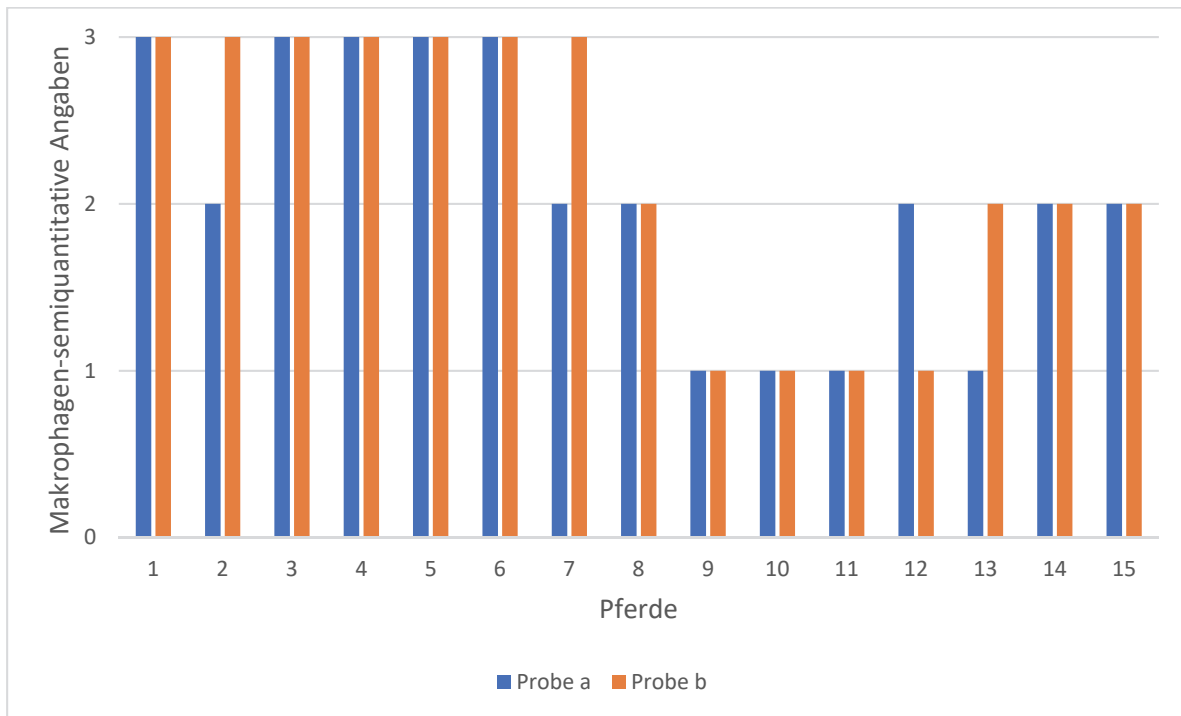


Abbildung 15: Intraindividuelle Varianz: Ergebnisse zu Makrophagen im TBS von Labor 5 Untersucher B zu allen 15 Pferden, semiquantitative Angaben beruhen auf den Befundbögen von Labor 5.

Bei dem statistischen Vergleich der Proben a und b erreichte Untersucher B der Klinik für Pferde eine exzellente intraindividuelle Übereinstimmung der Ergebnisse zu Makrophagen und neutrophilen Granulozyten in der BAL (ICC >0,9). Eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse wurde bei den Lymphozyten in der BAL erreicht (ICC 0,88). Die Ergebnisse der eosinophilen Granulozyten variierten, wie bereits dargestellt mehr, wodurch nur noch eine moderate Übereinstimmung erreicht werden konnte (ICC 0,62) (s. Abb. 16). Untersucher B machte in der BAL keine Angaben zu Mastzellen.

Im TBS erreichte Untersucher B dagegen, wie Untersucher A, eine insgesamt geringere Übereinstimmung der Ergebnisse bei mehreren Zellarten, was eine größere Varianz der Ergebnisse der Proben a und b widerspiegelt (s. Abb. 17). Untersucher B erreichte allein bei den Makrophagen und neutrophilen Granulozyten eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (gewichtetes Kappa >0,6). Die Übereinstimmung der Ergebnisse der eosinophilen Granulozyten war nur moderat (gewichtetes Kappa: 0,46). Die Ergebnisse aller weiteren beurteilten Parameter wie z.B. Lymphozyten, Mukus, Curschmannspiralen und mehrkernige Zellen variierten deutlich, sodass nur eine schlechte Übereinstimmung der Ergebnisse dieser Parameter vorlag. Alle weiteren nicht dargestellten Ergebnisse sind im Anhang in den Tabellen 9-24 zu finden.

Beim intraindividuellen Vergleich der Ergebnisse der Proben a und b des gleichen Pferdes wurden insgesamt durch die Untersucher A und B der Klinik für Pferde eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse zu wichtigen Zellarten in der BAL erreicht. Als wichtige Zellen werden hier die Zellarten der Differentialzellzählung bezeichnet, da ihr Anteil am Gesamtzellbild direkten Einfluss auf die Diagnosestellung hat. Die Varianz der Ergebnisse zwischen den Proben a und b zu den Zellarten der Differentialzellzählung war im TBS dagegen bei beiden Untersuchern größer. Somit lag nur eine gute Übereinstimmung bei wenigen Zellarten vor.

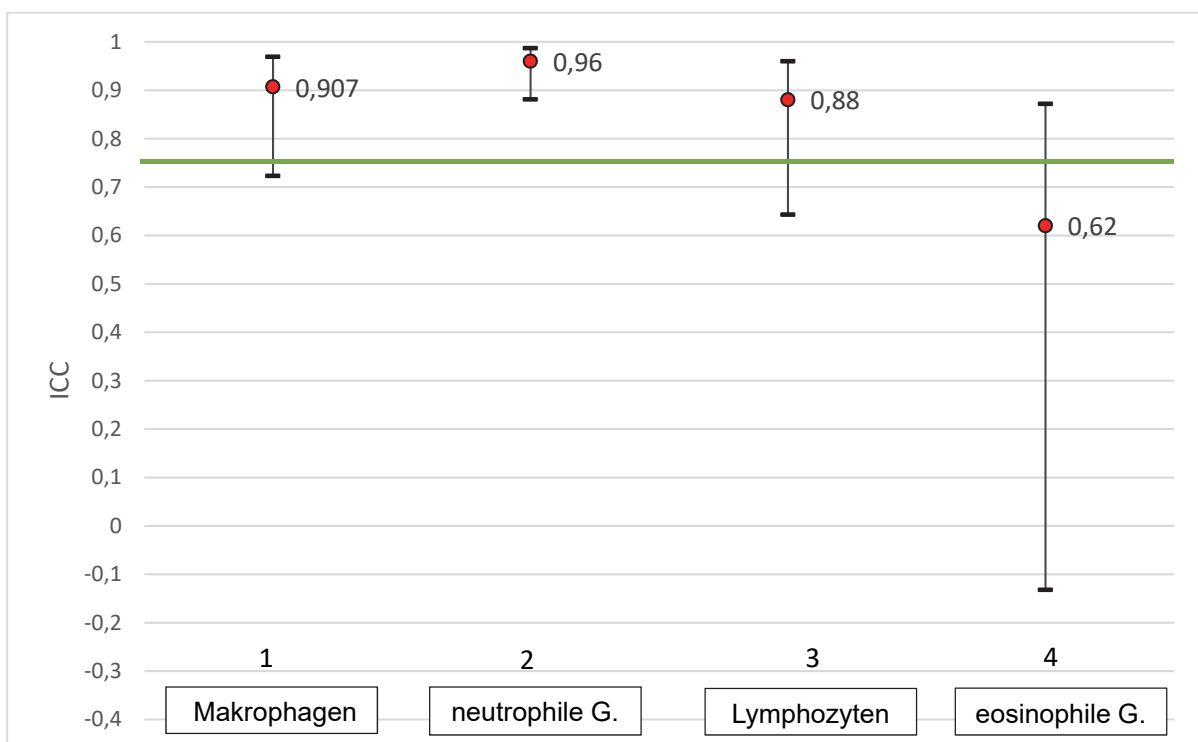


Abbildung 16: Intraindividuelle Übereinstimmung der Ergebnisse von Untersucher B zu verschiedenen Parametern in der BAL, roter Punkt stellt den ICC dar, zusätzlich ist das 95% Konfidenzintervall angegeben, Erklärung s. Abb. 10.

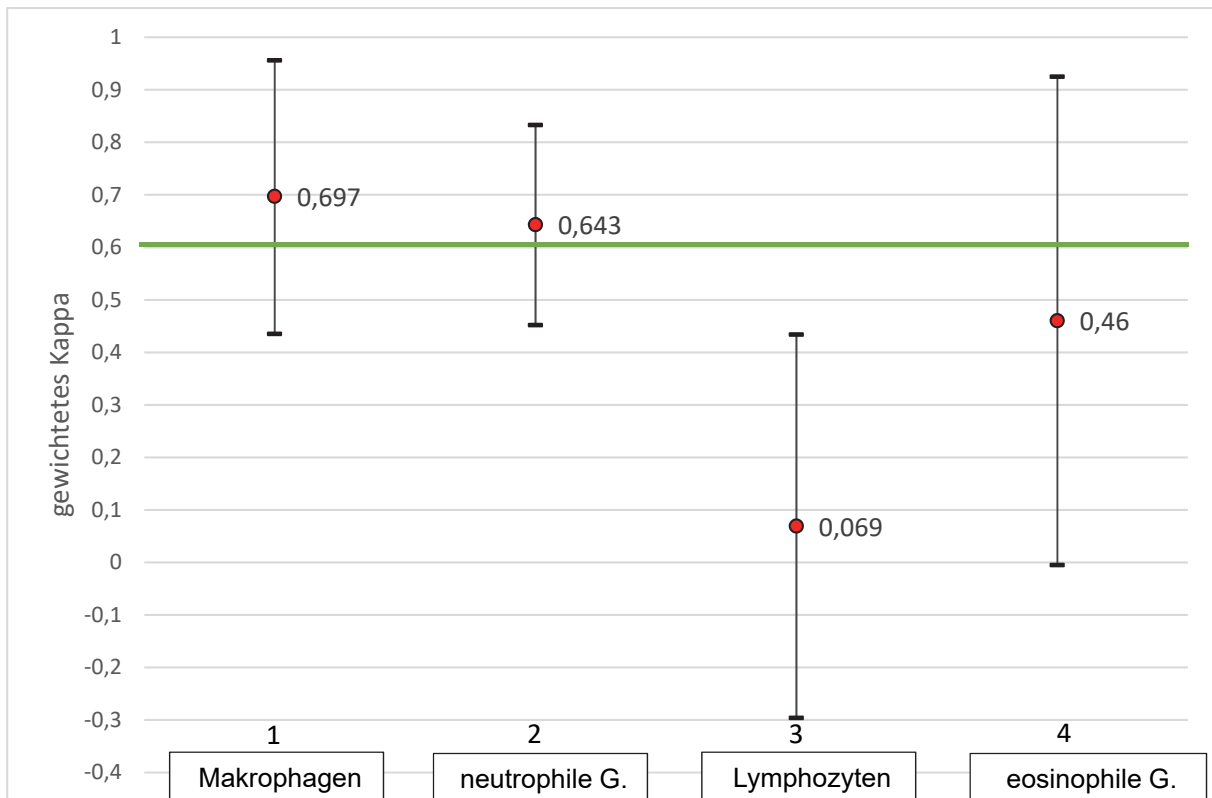


Abbildung 17: Intraindividuelle Übereinstimmung der Ergebnisse von Untersucher B zu verschiedenen Parametern im TBS, roter Punkt stellt das gewichtete Kappa dar, zusätzlich ist das 95% Konfidenzintervall angegeben, Erklärung s. Abb.10.

5.3.2 Ergebnisse der intraindividuellen Varianz der Fremdlabore

Aufgrund der unterschiedlichen Angaben zur Differentialzellzählung (semiquantitativ oder prozentual) der verschiedenen Fremdlabore musste die intraindividuelle Übereinstimmung der Ergebnisse der Proben a und b zu den Zellarten der Differentialzellzählung zwischen den Fremdlaboren unterschiedlich berechnet werden. Auch hier wurde bei den Laboren, die Prozentangaben zur Differentialzellzählung machen, der ICC und bei denen, die semiquantitative Angaben machten, das gewichtete Kappa berechnet.

Auf Nachfrage wurde von den Laboren 1-3 angegeben, dass die Zellarten, die in der Befundung nicht aufgeführt waren, bei der jeweiligen Probe nicht vorkamen. Dies war zum Beispiel bei den eosinophilen Granulozyten, die bei zwei Laboren (Labor 2 und 3) bei keiner der 30 TBS-Befunde aufgeführt wurden, der Fall. Ebenso verhielt es sich bei Bakterien, Curschmannspiralen und Fremdmaterial. Bei diesen Parametern wurde daher, wenn sie nicht erwähnt wurden, beim intra- und interindividuellen Vergleich eine Null angegeben. Bei fehlenden Angaben zur Zelldichte oder dem Gehalt an Mukus wurde dies als fehlende Werte interpretiert, da diese Angaben bei allen Ausstrichen hätten gemacht werden können. Somit

gibt es beim intra- und interindividuellen Vergleich bei diesen 2 Parametern einige fehlende Werte bei den Laboren. Die intraindividuelle Übereinstimmung der Ergebnisse zu einigen Parametern und verschiedenen Laboren konnte aufgrund von fehlenden Angaben oder geringer Unterschiede innerhalb der Ergebnisse nicht ausgewertet werden.

Im Folgenden werden auch bei den Ergebnissen der Fremdlabore nur die wichtigsten und klinisch relevanten Zellarten dargestellt. Alle weiteren Ergebnisse sind in den Tabellen 9-24 im Anhang zu finden. Die Darstellung der Ergebnisse der Proben a und b zu wichtigen Zellarten sowie die Darstellung der Werte zur Übereinstimmung der Ergebnisse erfolgt für die vier Fremdlabore wie im vorangegangenen Kapitel für die klinikinternen Untersucher.

Bei Labor 1 erfolgte im TBS und in der BAL die Differentialzellzählung semiquantitativ. In der Abbildung 18 sind die Ergebnisse der Proben a und b des gleichen Pferdes zu neutrophilen Granulozyten im TBS von Labor 1 dargestellt. Die semiquantitativen Begriffe wurden durch die Befundbögen von Labor 1 in Zahlenwerte umgewandelt (s. Tab. 4 und 5 im Anhang). Es ist zu erkennen, dass die Ergebnisse a und b z. T. variieren, allerdings ist das Ausmaß der Unterschiede zwischen den Ergebnissen meist gering.

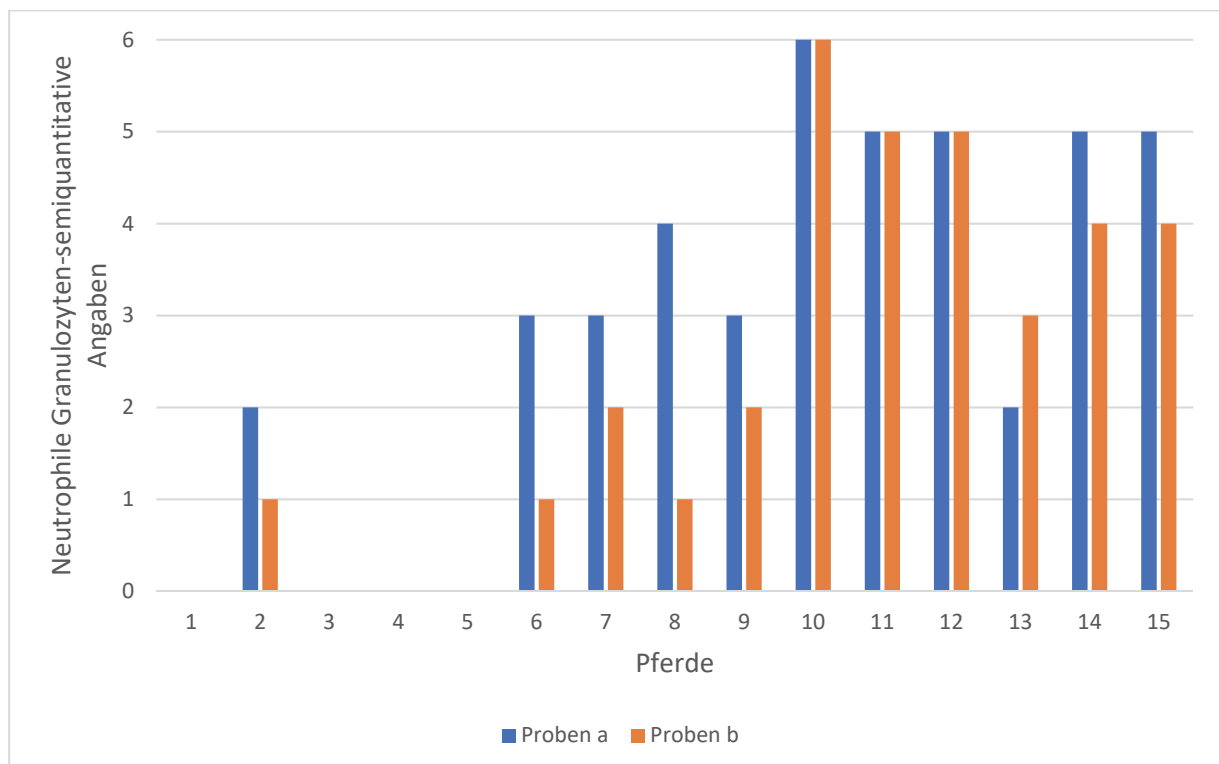


Abbildung 18: Intraindividuelle Varianz: Ergebnisse zu neutrophilen Granulozyten im TBS von Labor 1 zu allen 15 Pferden, semiquantitative Angaben beruhen auf den Befundbögen von Labor 1.

Beim intraindividuellen Vergleich (innerhalb des Labors) der zytologischen Ergebnisse der Proben a und b des gleichen Pferdes von Labor 1 konnten im TBS eine gute Übereinstimmung

bzw. Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu den neutrophilen Granulozyten erreicht werden (gewichtetes Kappa $>0,6$) (s. Abb. 20). In der BAL variierten bei diesem Labor die Ergebnisse der Proben a und b zu den Neutrophilen mehr, sodass eine moderate Übereinstimmung (Kappa: 0,519) der Ergebnisse erzielt wurde (s. Abb. 19). In der BAL erreichte Labor 1 bei den Mastzellen eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (gewichtetes Kappa 0,625). Bei allen weiteren Zellarten der Differentialzellzählung wurde weder im TBS noch in der BAL bei Labor 1 eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse erzielt (s. Abb. 19 und 20).

Wie auch bei den Untersuchern der Klinik für Pferde variierten die Ergebnisse aller weiteren untersuchten Parameter (u.a. Mukus, Curschmannspiralen, Zellzahl) deutlich, sodass eine schlechte Übereinstimmung der Ergebnisse erreicht wurde. In den nachfolgenden Abbildungen (19 und 20) sind das gewichtete Kappa (Maß der Übereinstimmung der Ergebnisse) und das 95% Konfidenzintervall dargestellt.

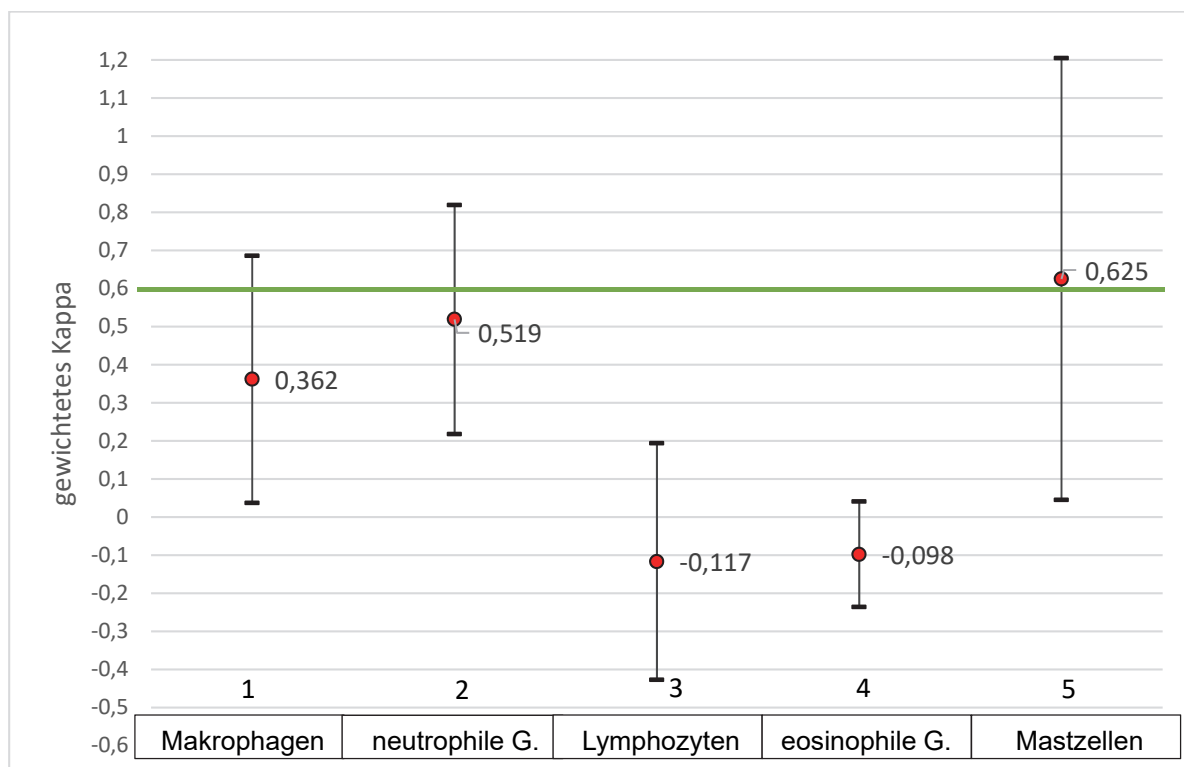


Abbildung 19: Intraindividuelle Übereinstimmung der Ergebnisse von Labor 1 zu verschiedenen Parametern in der BAL, roter Punkt stellt das gewichtete Kappa dar, zusätzlich ist das 95% Konfidenzintervall angegeben, Erklärung s. Abb. 10.

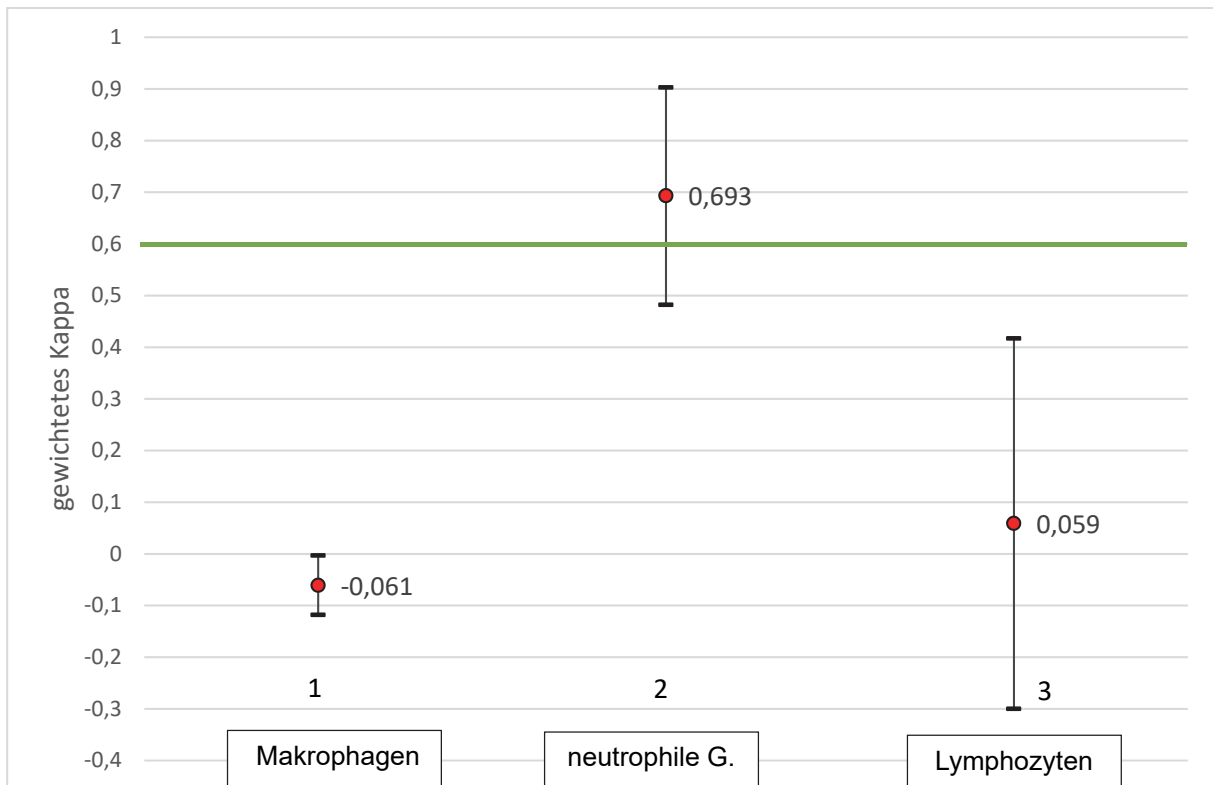


Abbildung 20: Intraindividuelle Übereinstimmung der Ergebnisse von Labor 1 zu verschiedenen Parametern in der TBS, roter Punkt stellt das gewichtete Kappa dar, zusätzlich ist das 95% Konfidenzintervall angegeben, Erklärung s. Abb.10.

Die nachfolgenden Darstellungen (Abb. 21 und 22) zeigen die Ergebnisse der Proben a und b von Labor 2 zu den Makrophagen und neutrophilen Granulozyten in der BAL. Auch Labor 2 führte die Differentialzellzählung semiquantitativ durch. Es ist zu erkennen, dass die Ergebnisse der Makrophagen zwischen den zwei Proben mehr variieren als bei den neutrophilen Granulozyten. Dies spiegelt sich ebenfalls im dem berechneten Maß der Übereinstimmung (gewichtetes Kappa) der beiden Parameter wider, wobei die Ergebnisse der neutrophilen Granulozyten eine bessere Übereinstimmung zeigten (s. Abb 24). Beispielhaft sind ebenfalls die Ergebnisse zu den Curschmannspiralen im TBS von Labor 2 dargestellt. Hier ist zu erkennen, dass eine große Varianz der Ergebnisse vorliegt (s. Abb. 23). Sind Säulendiagramme in den Abbildungen nicht dargestellt, kam dieser Parameter nicht in der Probe vor.

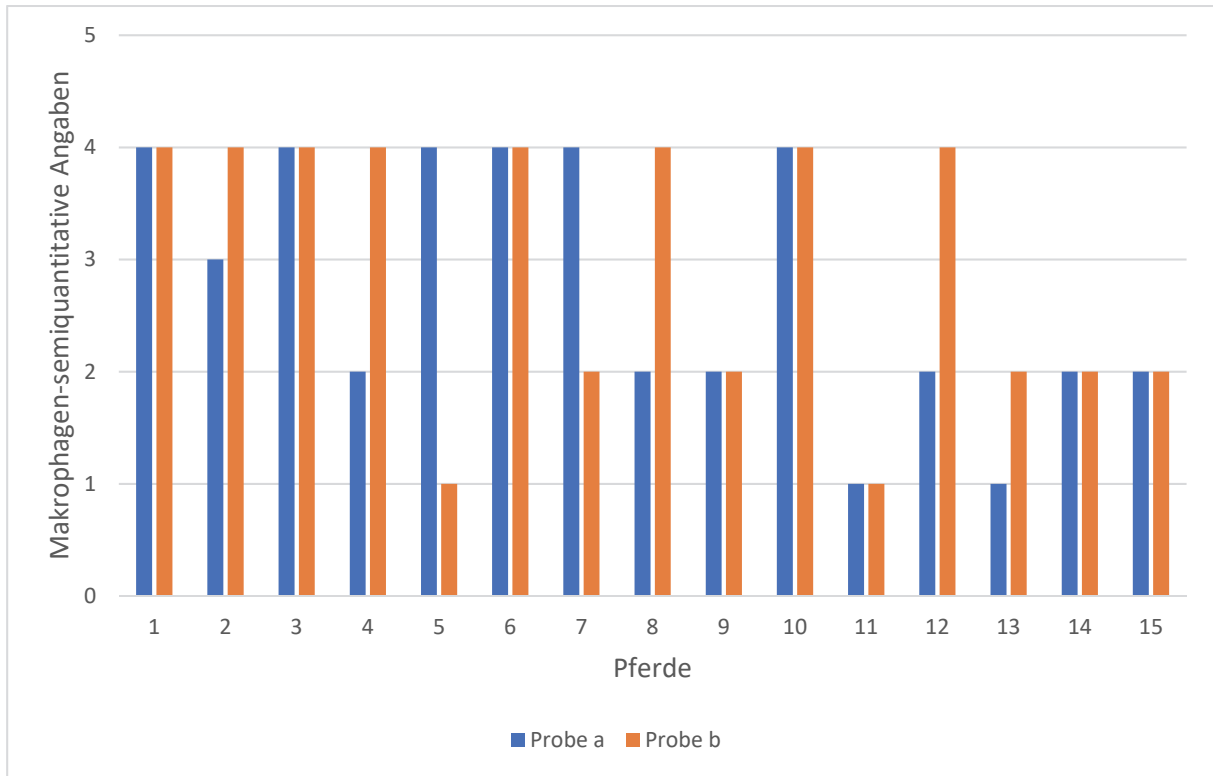


Abbildung 21: Intraindividuelle Varianz: Ergebnisse zu Makrophagen in der BAL von Labor 2 zu allen 15 Pferden, semiquantitative Angaben beruhen auf den Befundbögen von Labor 2.

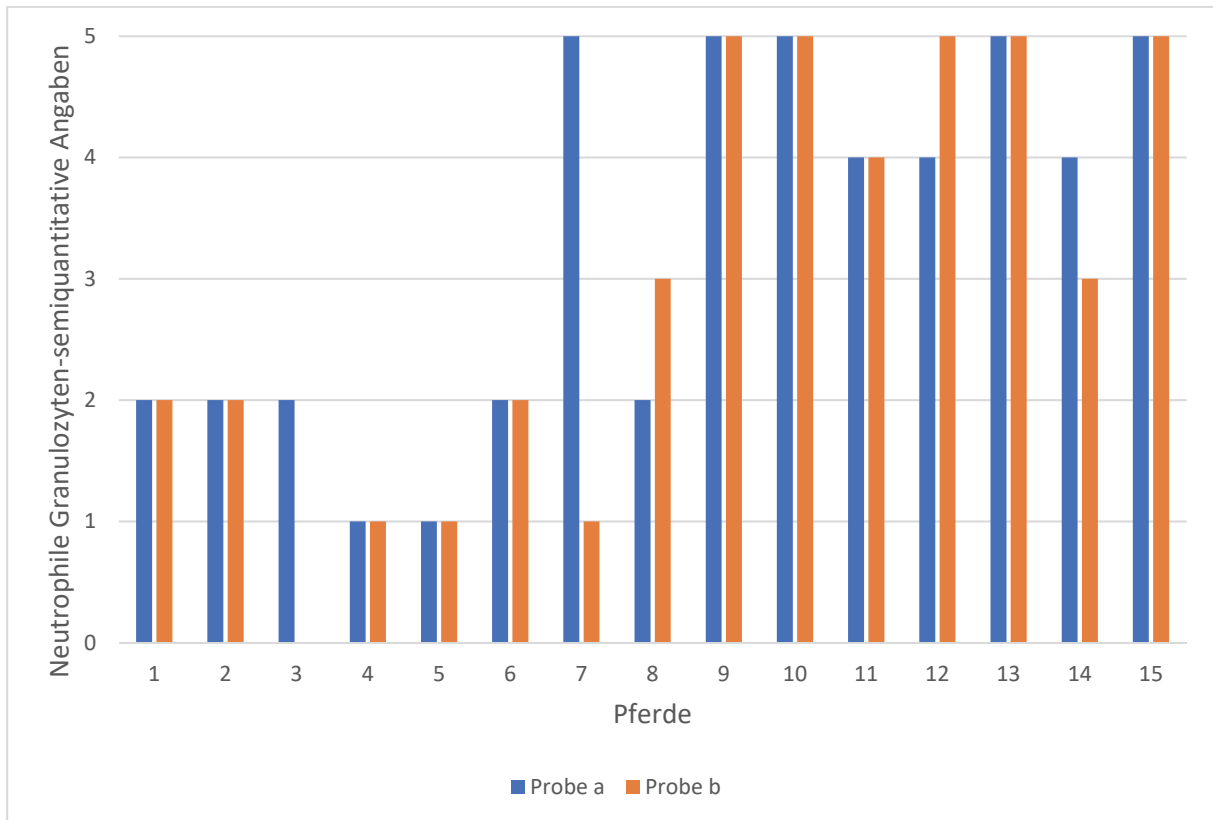


Abbildung 22: Intraindividuelle Varianz: Ergebnisse zu neutrophilen Granulozyten im TBS von Labor 2 zu allen 15 Pferden, semiquantitative Angaben beruhen auf den Befundbögen von Labor 2.

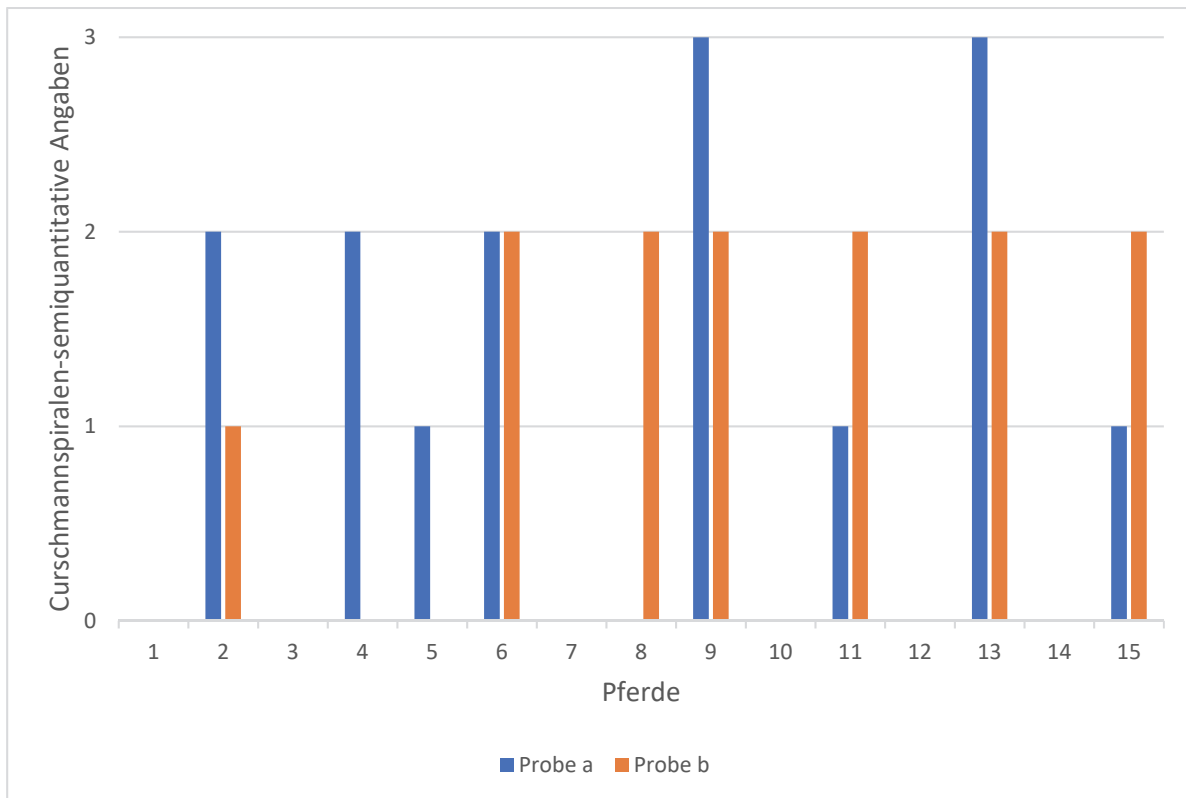


Abbildung 23: Intraindividuelle Varianz: Ergebnisse zu Curschmannspiralen im TBS von Labor 2 zu allen 15 Pferden, semiquantitative Angaben beruhen auf den Befundbögen von Labor 2.

Die Abbildungen 24 und 25 stellen das gewichtete Kappa und das 95%-Konfidenzintervall dar. Es ist zu erkennen, dass Labor 2 in der BAL und im TBS eine gute Übereinstimmung (gewichtetes Kappa > 0,6) der Ergebnisse zu den neutrophilen Granulozyten zeigte. Bei den Makrophagen, Lymphozyten und in der BAL auch bei den eosinophilen Granulozyten konnte dagegen keine gute Übereinstimmung der Ergebnisse erreicht werden (gewichtetes Kappa < 0,4). Die Ergebnisse zu Mastzellen in der BAL und zu eosinophilen Granulozyten im TBS konnten nicht ausgewertet werden, da keine Angaben zu diesen Zellarten von Labor 2 gemacht wurden bzw. zu selten.

Ergebnisse

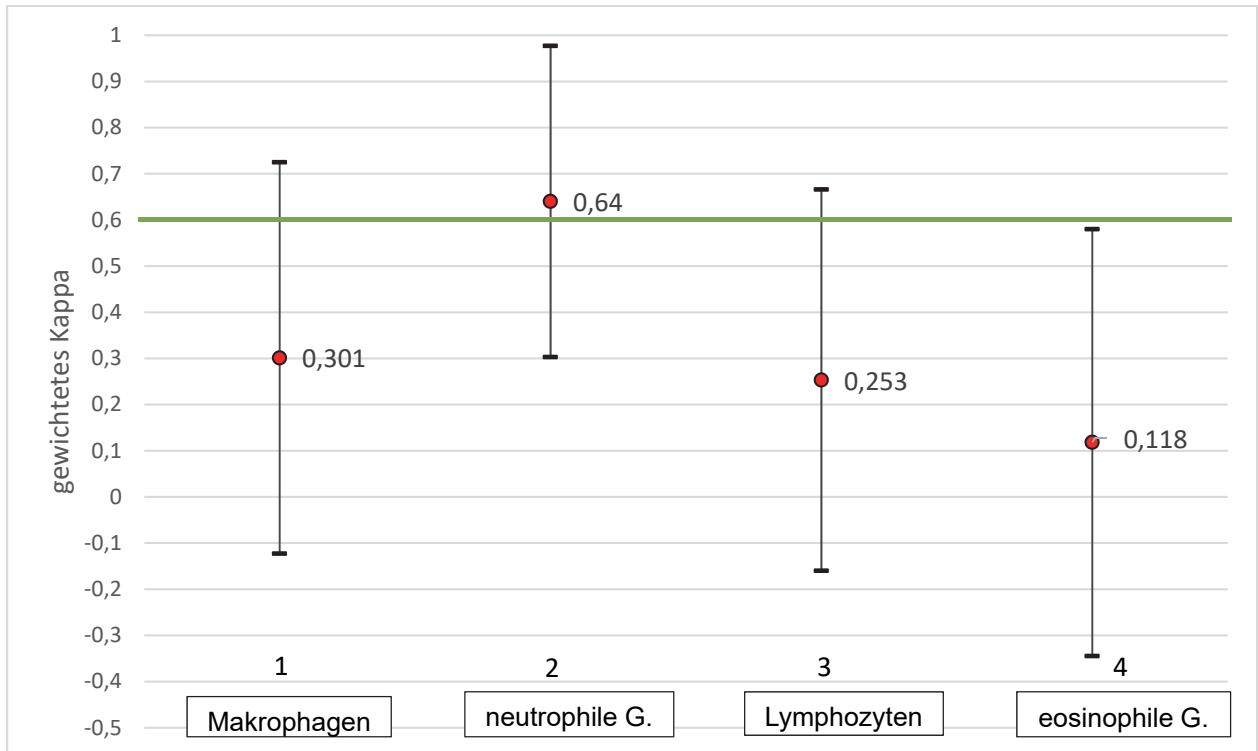


Abbildung 24: Intraindividuelle Übereinstimmung der Ergebnisse von Labor 2 zu verschiedenen Parametern in der BAL, roter Punkt stellt das gewichtete Kappa dar, zusätzlich ist das 95% Konfidenzintervall angegeben, Erklärung s. Abb. 10.

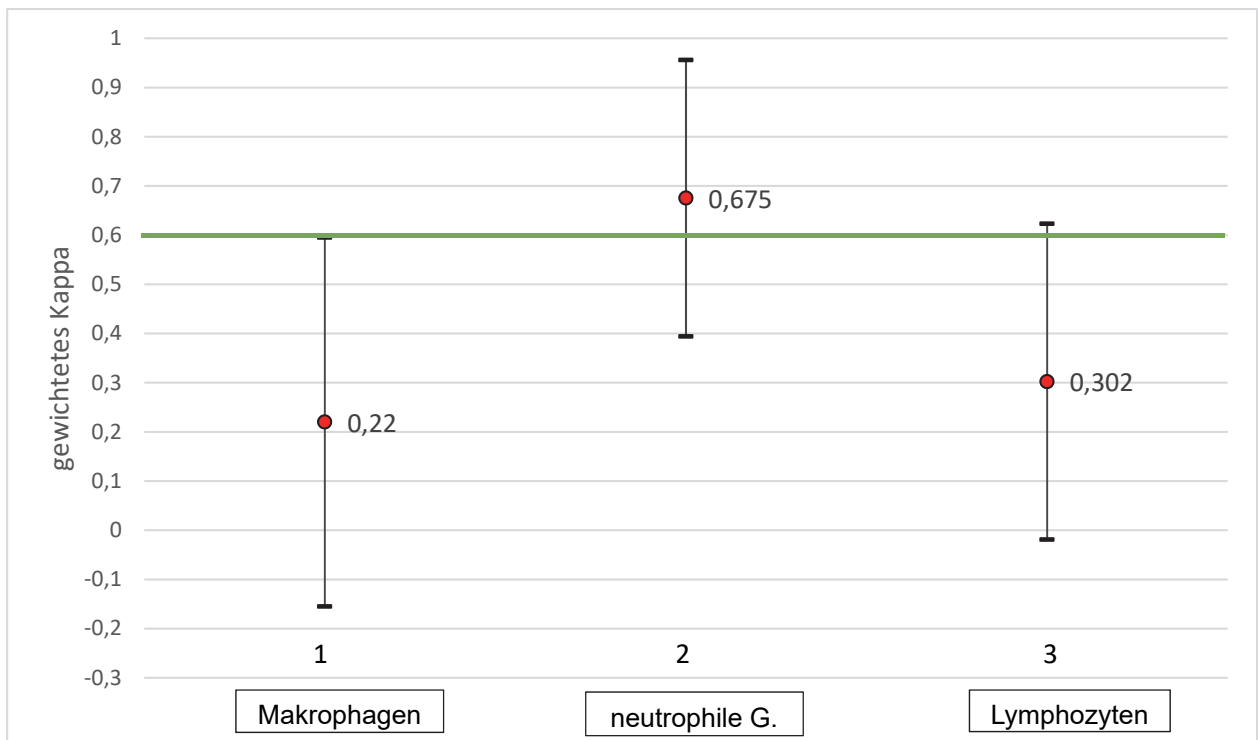


Abbildung 25: Intraindividuelle Übereinstimmung der Ergebnisse von Labor 2 zu verschiedenen Parametern im TBS, roter Punkt stellt das gewichtete Kappa dar, zusätzlich ist das 95% Konfidenzintervall angegeben, Erklärung s. Abb. 10.

Labor 3 gab zu den Zellarten der Differentialzellzählung im TBS und in der BAL Prozentangaben an, weswegen bei beiden Probenarten das ICC als Maß der Übereinstimmung berechnet wurde. In den Abbildungen 26 und 27 sind die Ergebnisse von Labor 3 zu den Proben a und b für neutrophile Granulozyten und Makrophagen in der BAL dargestellt. Man kann erkennen, dass die Ergebnisse zu den Proben des gleichen Pferdes nur eine geringe Varianz aufweisen. Dies wird ebenfalls durch die gute Übereinstimmung der Ergebnisse zu Makrophagen und neutrophilen Granulozyten verdeutlicht (s. Abb. 28).

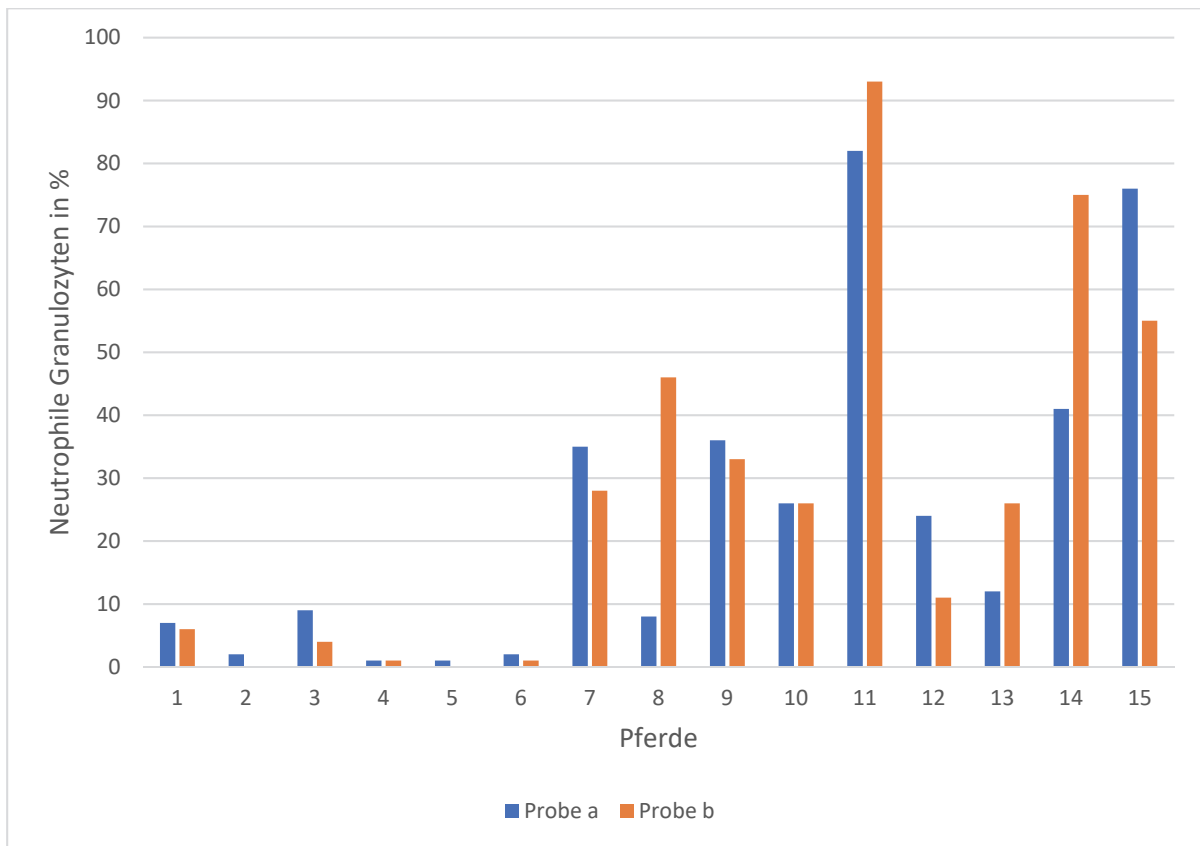


Abbildung 26: Intraindividuelle Varianz: Ergebnisse zu neutrophilen Granulozyten in der BAL von Labor 3 zu allen 15 Pferden.

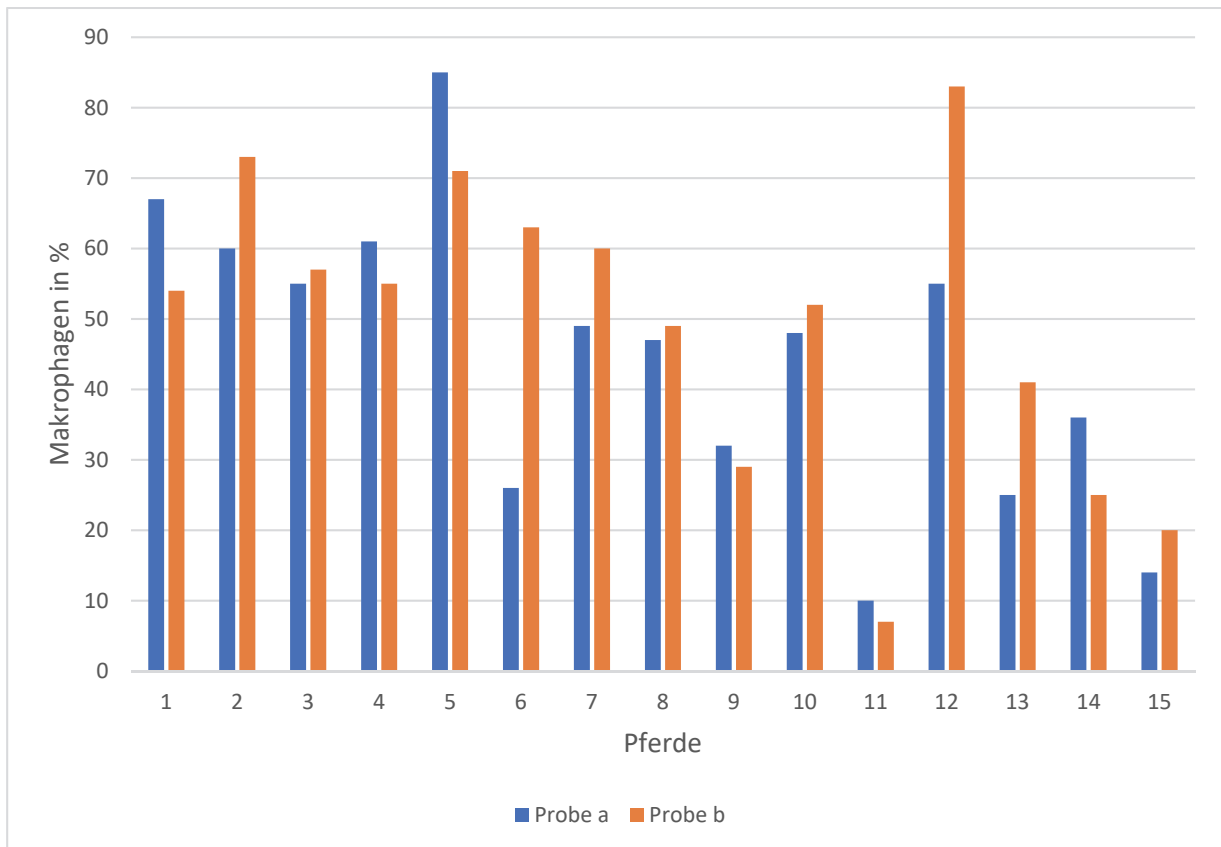


Abbildung 27: Intraindividuelle Varianz: Ergebnisse zu Makrophagen in der BAL von Labor 3 zu allen 15 Pferden.

In den folgenden Darstellungen zur Übereinstimmung der Ergebnisse von Labor 3 wurde das ICC (Maß der Übereinstimmung) und das 95%-Konfidenzintervall aufgetragen. Die grüne Linie markiert den Wert von 0,75, ab dem der ICC eine gute Übereinstimmung angibt. Werte oberhalb der Linie geben somit eine gute Übereinstimmung an. Es ist zu erkennen, dass Labor 3 eine gute Übereinstimmung bzw. Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu Makrophagen und neutrophilen Granulozyten in der BAL und im TBS und zu Mastzellen in der BAL erreicht (s. Abb. 28 und 29). Die Ergebnisse zu Lymphozyten erreichen in der BAL noch fast eine gute Übereinstimmung, allerdings nicht im TBS. Die Übereinstimmung der eosinophilen Granulozyten konnte nicht berechnet werden, da im TBS keine Werte vorlagen und in der BAL zu selten Ergebnisse zu eosinophilen Granulozyten angegeben wurden.

Ergebnisse

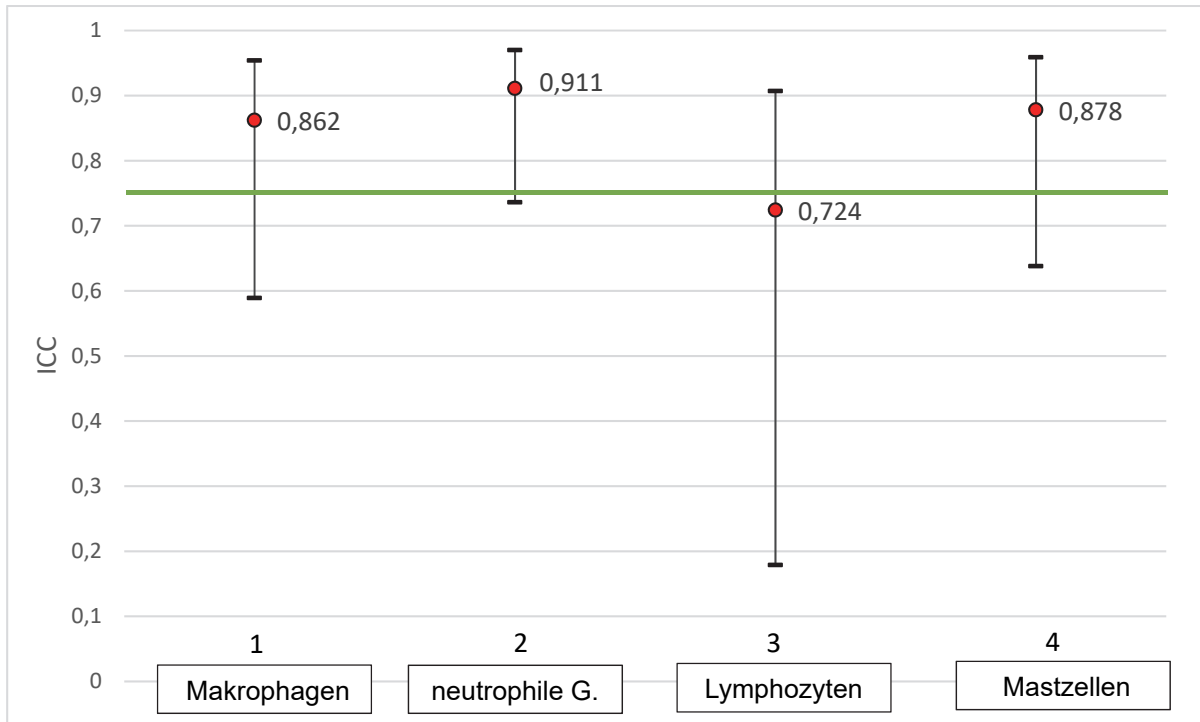


Abbildung 28: Intraindividuelle Übereinstimmung der Ergebnisse von Labor 3 zu verschiedenen Parametern in der BAL, roter Punkt stellt den ICC dar, zusätzlich ist das 95% Konfidenzintervall angegeben, Erklärung s. Abb.10.

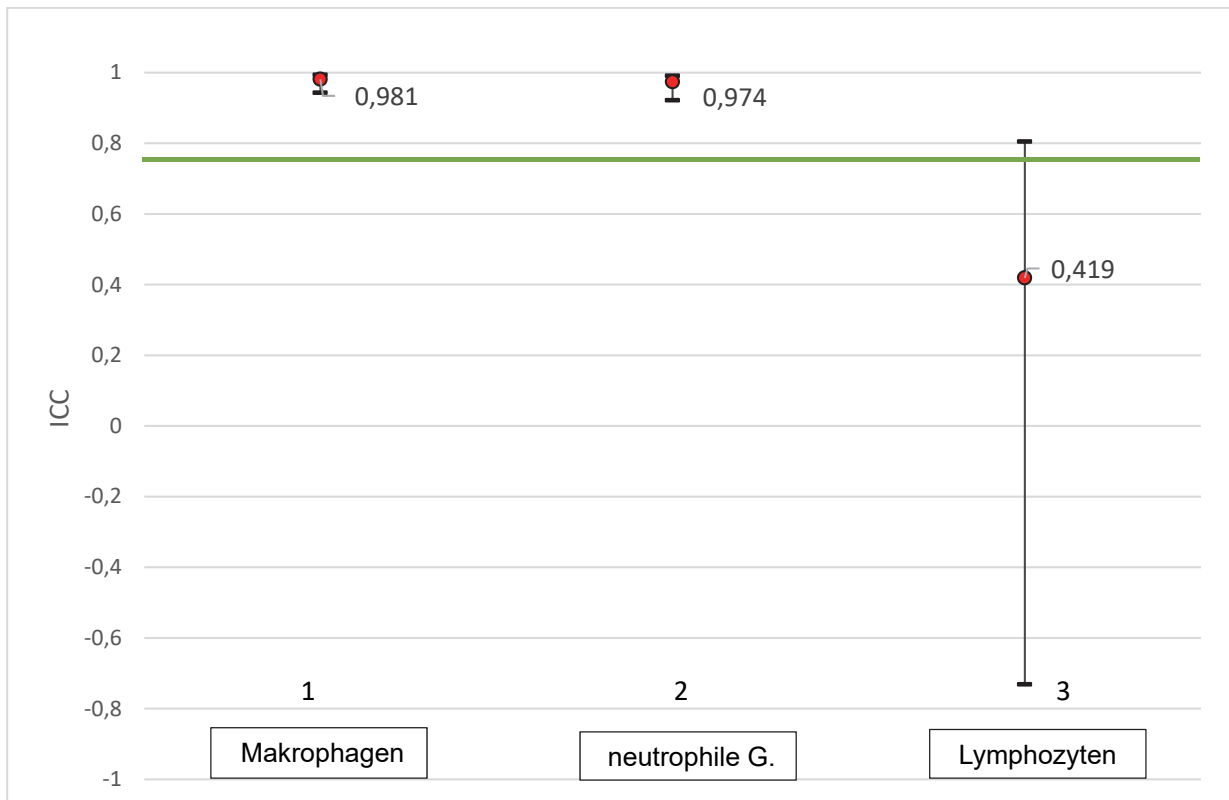


Abbildung 29: Intraindividuelle Übereinstimmung der Ergebnisse von Labor 3 zu verschiedenen Parametern im TBS, roter Punkt stellt den ICC dar, zusätzlich ist das 95% Konfidenzintervall angegeben, Erklärung s. Abb.10.

Auch Labor 4 machte Prozentangaben zu den Zellarten der Differentialzellzählung. Dieses Labor gab nur einen Befund für TBS oder BAL. Das Labor gab an immer den zellreicheren Ausstrich zu beurteilen, daher ist nicht klar, welche Probe beurteilt wurde. In der Abbildung 30 sind die Ergebnisse von Labor 4 zu Lymphozyten dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Ergebnisse bei mehreren Pferden deutlich variieren. Dies spiegelt sich in der schlechten Übereinstimmung der Ergebnisse zu Lymphozyten (ICC: -0,046) dieses Labors wider. Ebenso ist das 95%-Konfidenzintervall für die Lymphozyten sehr groß, was die große Varianz einiger Ergebnisse verdeutlicht. Bei den Ergebnissen zu Makrophagen und neutrophilen Granulozyten wurde dagegen eine gute Übereinstimmung (ICC: 0,85 und 0,895) erreicht (s. Abb. 31). Für die Übereinstimmung der Ergebnisse zu eosinophilen Granulozyten und Mastzellen musste das gewichtete Kappa berechnet werden, daher sind diese Zellarten nicht dargestellt. Diese Zellarten erreichten keine gute Übereinstimmung (s. Tab. 10 im Anhang).

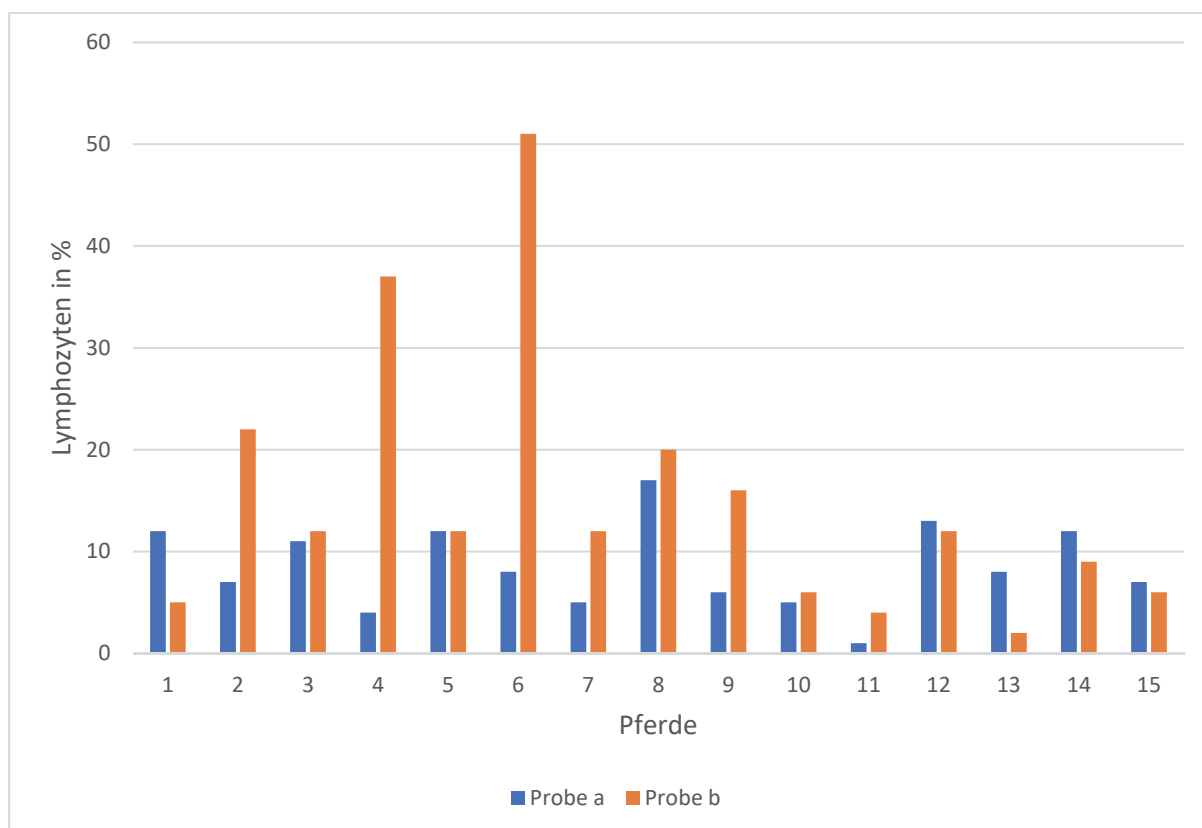


Abbildung 30: Intraindividuelle Varianz: Ergebnisse zu Lymphozyten in der BAL oder TBS (keine Angabe welche Probe) von Labor 4 zu allen 15 Pferden.

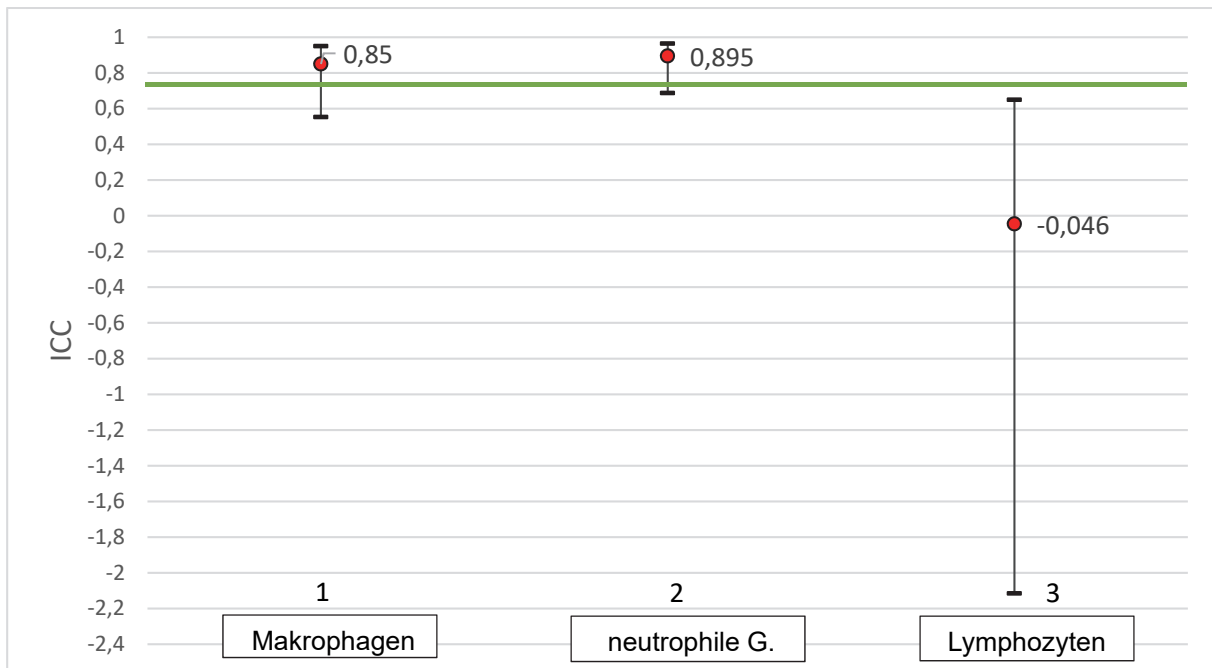


Abbildung 31: Intraindividuelle Übereinstimmung der Ergebnisse von Labor 4 zu verschiedenen Parametern in der BAL oder TBS, roter Punkt stellt das gewichtete Kappa dar, zusätzlich ist das 95% Konfidenzintervall angegeben, Erklärung s. Abb.10.

Alle Fremdlabore zeigten bei der Beurteilung aller weiteren Parameter (Mucus, Curschmannspiralen, Bakterien, Epithelzellen, Fremdmaterial, mehrkernige Zellen) eine hohe intraindividuelle Varianz der Ergebnisse und damit eine schlechte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse des gleichen Pferdes.

Die in diesem Kapitel nicht dargestellten Ergebnisse, sind in den Tabellen 9-24 im Anhang nachzuvollziehen. Dort angegeben sind ebenfalls die Werte der Übereinstimmung für die jeweiligen Parameter sowie das dazugehörige 95%-Konfidenzintervall.

Generell kann beim intraindividuellen Vergleich festgestellt werden, dass die Übereinstimmung der Ergebnisse zu den Proben a und b des gleichen Pferdes für neutrophile Granulozyten in der BAL und im TBS bei den Fremdlaboren gut ist. Die Übereinstimmung der Ergebnisse zu den Makrophagen und z.T. zu den Lymphozyten ist allerdings bei den Laboren, die Prozentangaben zur Differentialzellzählung der BAL machten, besser als die Übereinstimmung der Ergebnisse der Labore, die semiquantitativen Angaben machten. Zum Teil kann dieses Ergebnis auch für Mastzellen und eosinophile Granulozyten beobachtet werden. Für einige Parameter wurden große 95%-Konfidenzintervalle angegeben, was ebenfalls auf eine große Varianz der Ergebnisse schließen lässt und eine ungenaue Schätzung der Übereinstimmung widerspiegelt.

Die Ergebnisse der intraindividuellen Übereinstimmung zu den Zellarten der Differentialzellzählung fallen für das TBS insgesamt etwas schlechter aus als für die BAL bei den Fremdlaboren und den Untersuchern A und B der Klinik für Pferde. Beim TBS wurden

abgesehen von zwei Laboren nur semiquantitative Angaben zur Differentialzellzählung angegeben, was mit einer schlechteren Reproduzierbarkeit der Ergebnisse verbunden war. Die prozentualen Angaben von Labor 3 zur Differentialzellzählung beim TBS zeigten ebenfalls nur bei neutrophilen Granulozyten und Makrophagen gute bis exzellente Ergebnisse in der Übereinstimmung.

5.4 Ergebnisse der interindividuellen Varianz

Das erste Ergebnis im Rahmen der Untersuchung der interindividuellen Varianz war die Erkenntnis, dass verschiedene Labore innerhalb Deutschlands unterschiedliche Angaben zur Differentialzellzählung von TBS und BAL machten. Trotz der allgemein anerkannten Referenzwerte aus dem Consensus Statement der IAD zu den neutrophilen Granulozyten, Mastzellen und eosinophilen Granulozyten, welche auf der Zählung kernhaltiger Zellen beruhen, geben manche Labore dennoch semiquantitative Angaben zur Differentialzellzählung in der BAL an (Couetil et al. 2016). Auch eine laborübergreifende Vereinheitlichung, welche Zellen in die Differentialzellzählung aufgenommen werden, besteht nicht, sodass ein Labor Epithelzellen mit einbezogen hat.

Mit Hilfe des in Kapitel 3.6. vorgestellten vereinheitlichten Scoring Systems konnten die Ergebnisse der Labore und der Untersucher A und B der Klinik für Pferde (Labor 5) vereinheitlicht und verglichen werden. Somit wurden die Ergebnisse aller Labore in Bezug auf ein Pferd verglichen. Auch hier wurde für alle Parameter, die in der zytologischen Beurteilung erwähnt wurden, die Übereinstimmung der 6 Ergebnisse der vier Fremdlabore und zwei Untersucher zu einem Pferd überprüft. Als Maß für die Übereinstimmung der Ergebnisse zu den einzelnen Parametern wurde hierfür Krippendorff's α berechnet und sich an den von Krippendorff festgelegten Grenzwerten zur Interpretation der Ergebnisse orientiert.

Zunächst sind in den Abbildungen 32-37 die Mittelwerte der Ergebnisse aus den Proben a und b aller 4 Fremdlabore und der Untersucher A und B der Klinik für Pferde (Labor 5) zu ausgewählten Zellarten dargestellt. Die neutrophilen Granulozyten und auch die Makrophagen sind wichtige Zellarten, die einen großen Teil zur zytologischen Diagnosestellung beitragen. Aus diesem Grund wurde sich auf die Darstellung dieser Zellarten in der BAL beschränkt. Es ist zu erkennen, dass die Ergebnisse zwischen allen Laboren und Untersuchern bei Makrophagen und neutrophilen Granulozyten variieren. Dennoch ist zu erkennen, dass es bei den Makrophagen besonders durch Labor 2 häufiger größere Unterschiede in den Ergebnissen gibt. Dies resultierte in einer geringeren Übereinstimmung der Ergebnisse der Makrophagen im Vergleich zu den neutrophilen Granulozyten.

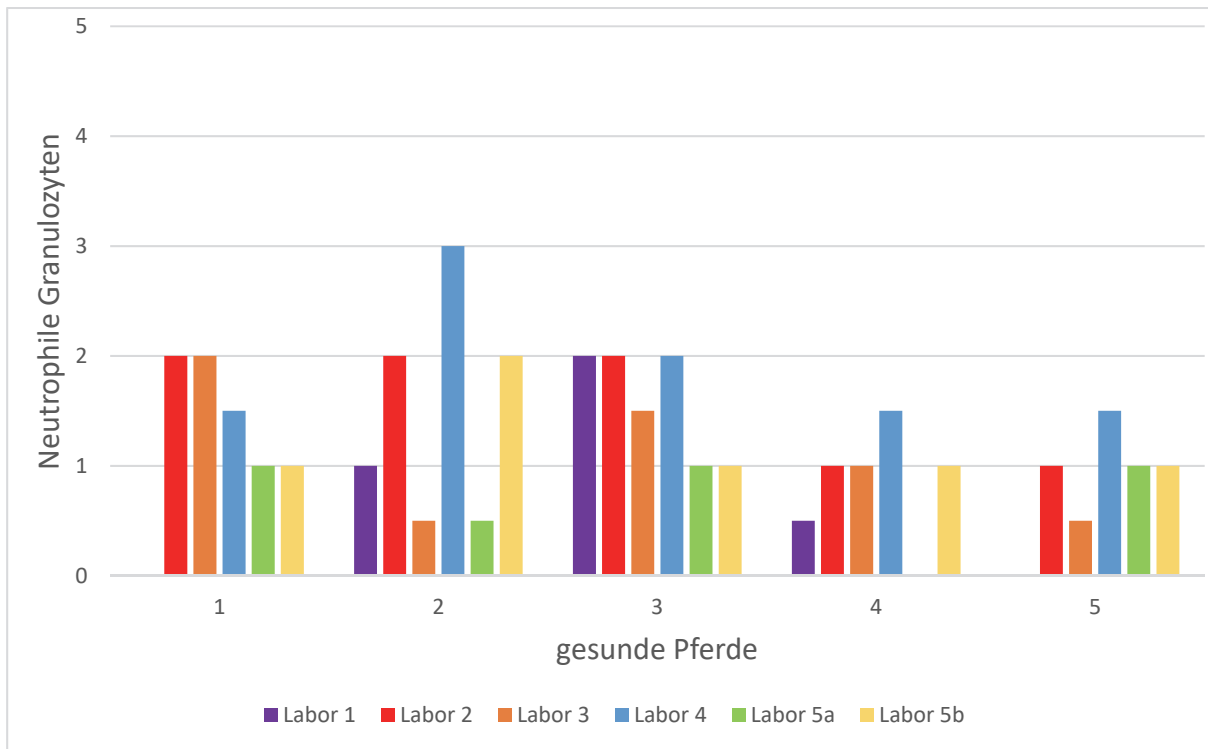


Abbildung 32: Interindividueller Vergleich der Ergebnisse zu neutrophilen Granulozyten in der BAL aller Labore bzw. Untersucher zu den gesunden Pferden, Zahlenwerte sind durch die Übertragung der Ergebnisse in das vereinheitlichte Scoring System entstanden, Ergebnisse sind die Mittelwerte aus den Proben a und b von jedem Labor.

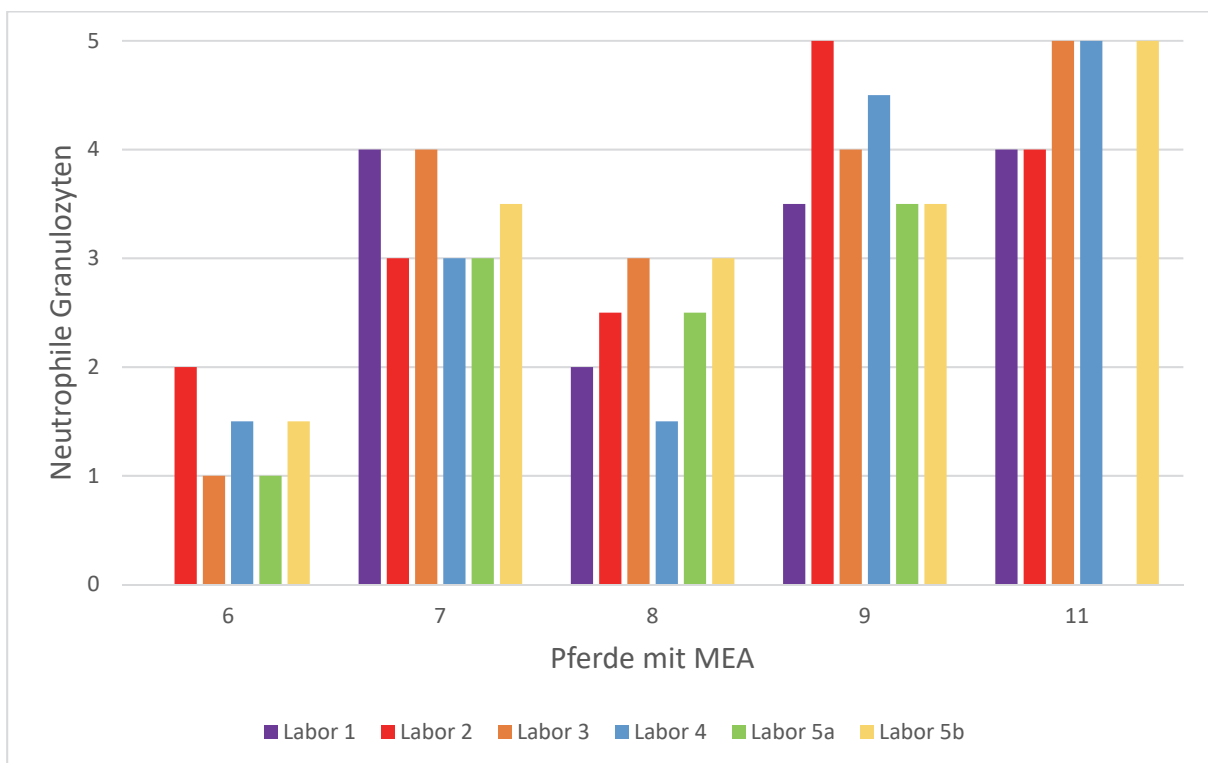


Abbildung 33: Interindividueller Vergleich der Ergebnisse zu neutrophilen Granulozyten in der BAL aller Labore bzw. Untersucher zu den Pferden mit MEA, Erklärung Zahlenwerte s. Abb 32.

Ergebnisse

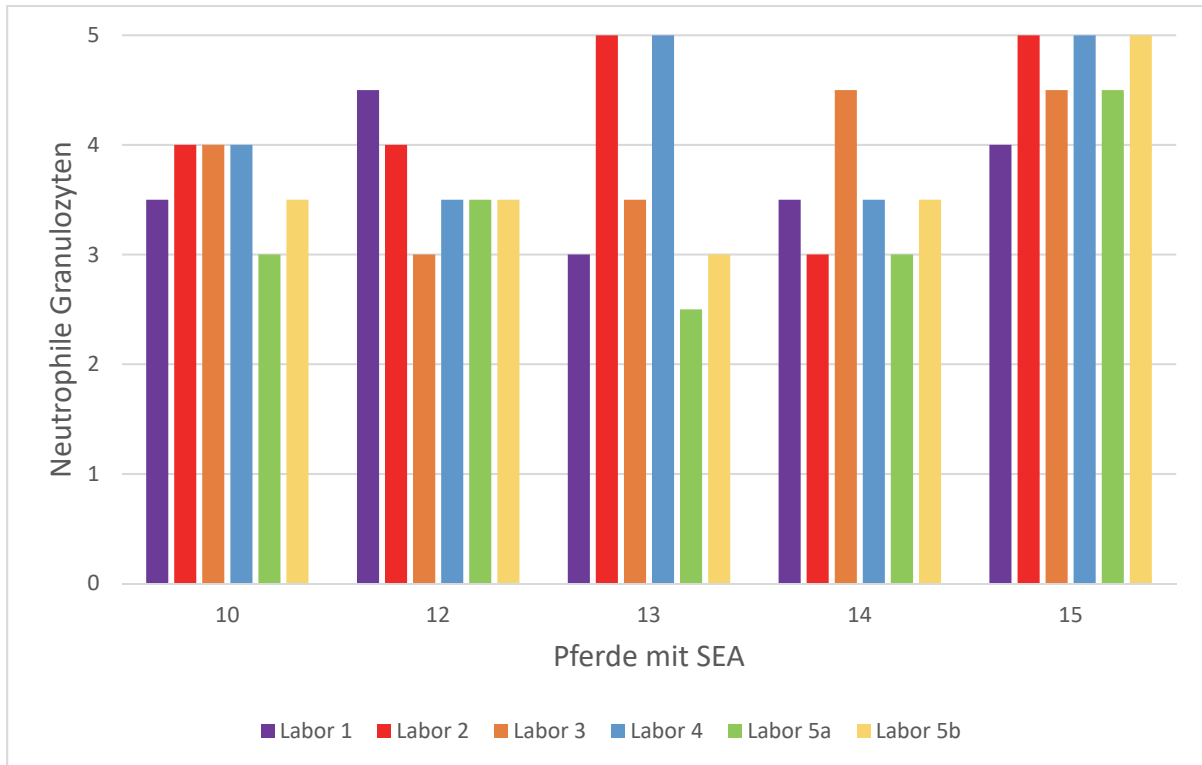


Abbildung 34: Interindividueller Vergleich der Ergebnisse zu neutrophilen Granulozyten in der BAL aller Labore bzw. Untersucher zu den Pferden mit SEA, Erklärung Zahlenwerte s. Abb. 32.

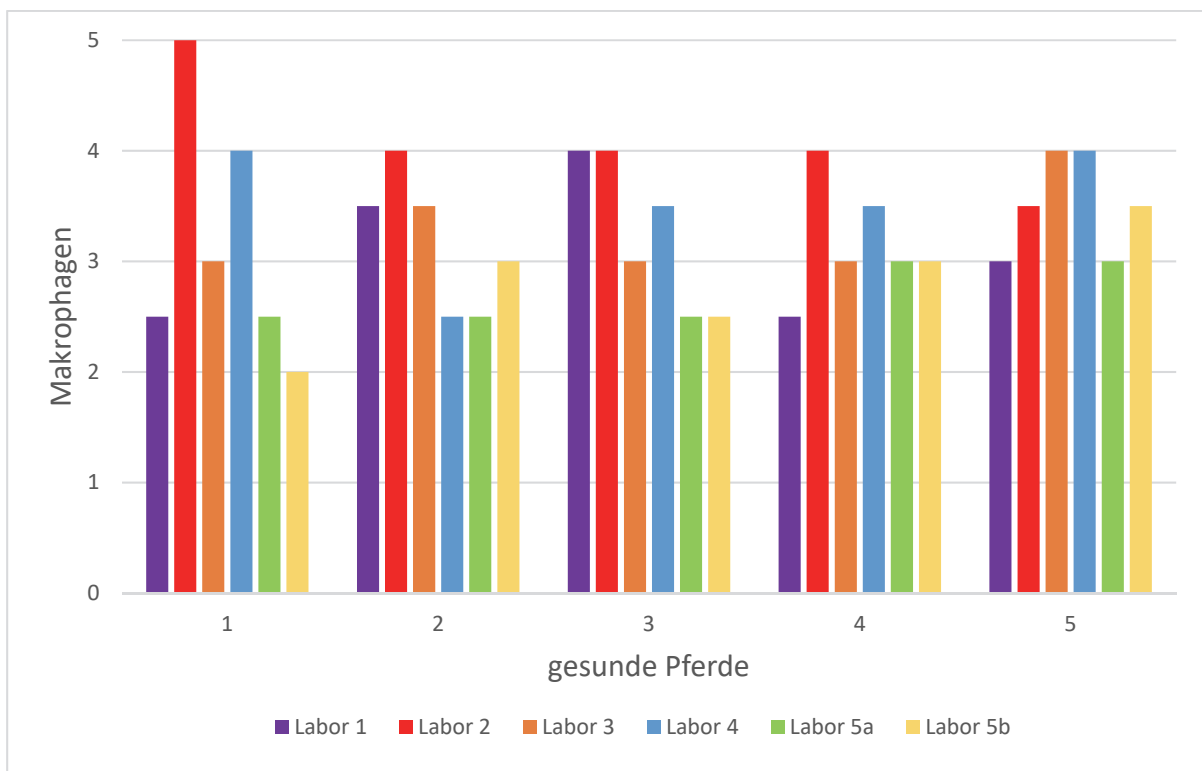


Abbildung 35: Interindividueller Vergleich der Ergebnisse zu Makrophagen in der BAL aller Labore bzw. Untersucher zu den gesunden Pferden, Erklärung Zahlenwerte s. Abb. 32.

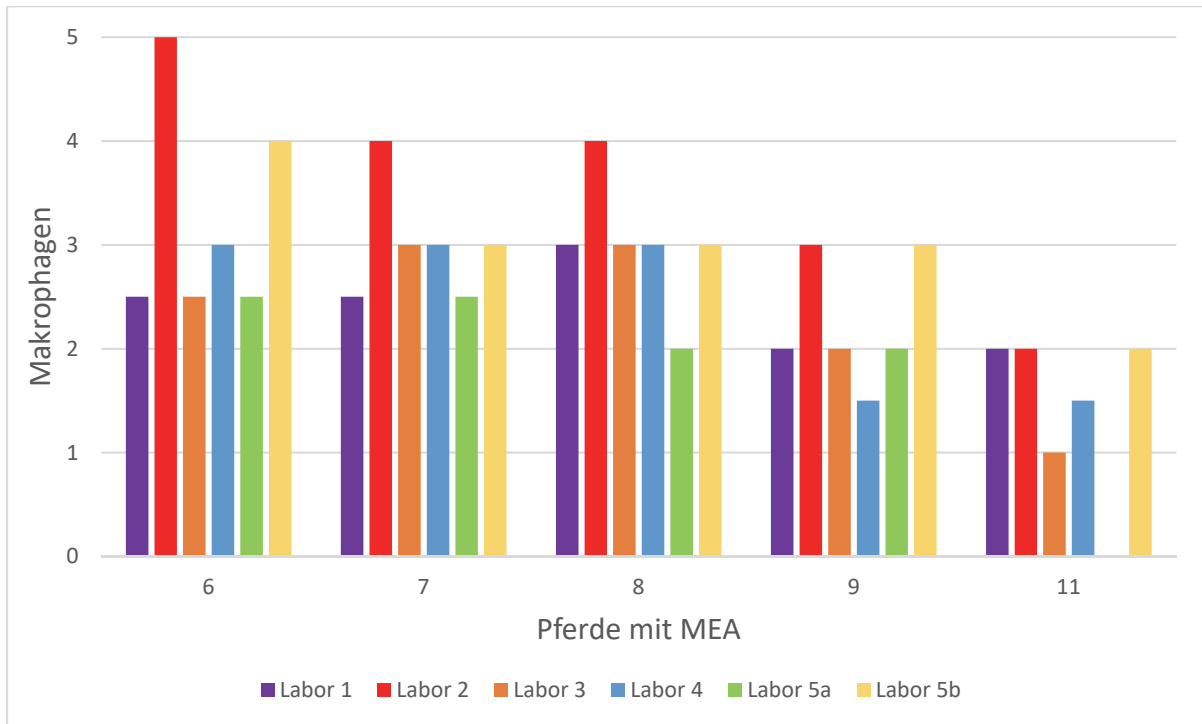


Abbildung 36: Interindividueller Vergleich der Ergebnisse zu Makrophagen in der BAL aller Labore bzw. Untersucher zu den Pferden mit MEA, Erklärung Zahlenwerte s. Abb. 32.

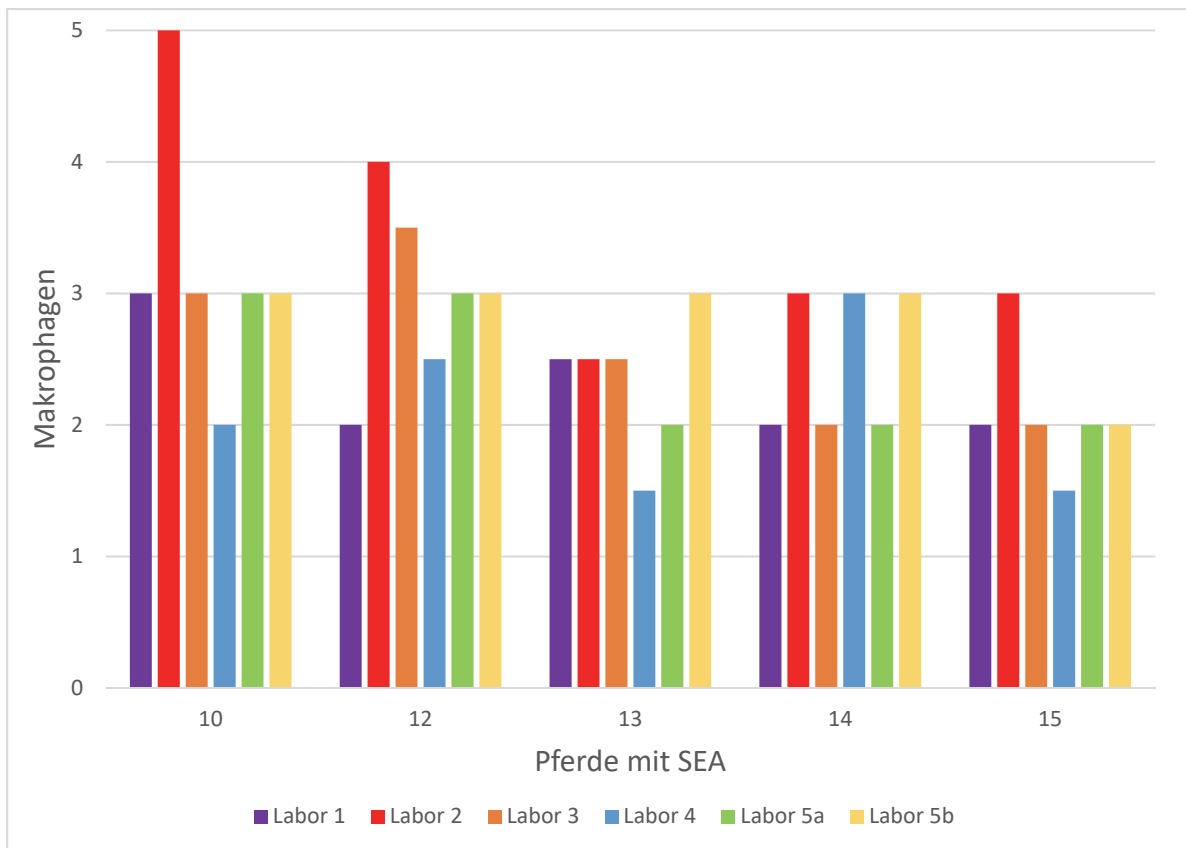


Abbildung 37: Interindividueller Vergleich der Ergebnisse zu Makrophagen in der BAL aller Labore bzw. Untersucher zu den Pferden mit SEA, Erklärung Zahlenwerte s. Abb. 32.

Es ist festzustellen, dass nur eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse für die Angaben der neutrophilen Granulozyten zwischen allen 6 Laboren erreicht wurde. Dieses Ergebnis ist für das TBS und die BAL gleichermaßen zu erwähnen (Krippendorff's α TBS: 0,729, BAL: 0,703). Auch das 95%ige-Konfidenzintervall ist hier klein, sodass man davon ausgehen kann, dass eine genaue Schätzung der Übereinstimmung vorliegt (TBS: 0,691-0,761; BAL: 0,659-0,74) (s. Abb. 38 und 39).

Die Ergebnisse aller weiteren Parameter, die beurteilt wurden, wiesen in der BAL und im TBS eine geringere Übereinstimmung (Krippendorff's $\alpha < 0,67$) zwischen den 6 Laboren auf. Ebenso sind die 95% Konfidenzintervalle z.T. groß, was auch hier eine große Varianz der Ergebnisse und eine ungenaue Schätzung der Übereinstimmung widerspiegelt.

In den Abbildungen 38 und 39 sind die Werte des Krippendorff's α an den roten Punkten im Graphen sowie die dazugehörigen 95%-Konfidenzintervalle für ausgewählte Parameter im TBS und der BAL dargestellt. Die grüne Linie markiert den Wert von 0,67, ab dem das Krippendorff's α eine gute Übereinstimmung angibt. Die dargestellten Parameter (Makrophagen, Neutrophile, Eosinophile, Mastzellen, Bakterien) wurden ausgewählt, da sie direkten Einfluss auf die zytologische Diagnosestellung haben. Die Ergebnisse aller weiteren beurteilten Parametern sind in der Tabelle 25 im Anhang nachzuvollziehen.

Anzumerken ist, dass alle Ergebnisse der Labore in das vereinheitliche Beurteilungsschema übertragen wurden und somit nicht mehr die ursprünglichen Angaben der Labore wie zum Beispiel die genauen Prozentzahlen verglichen wurden.

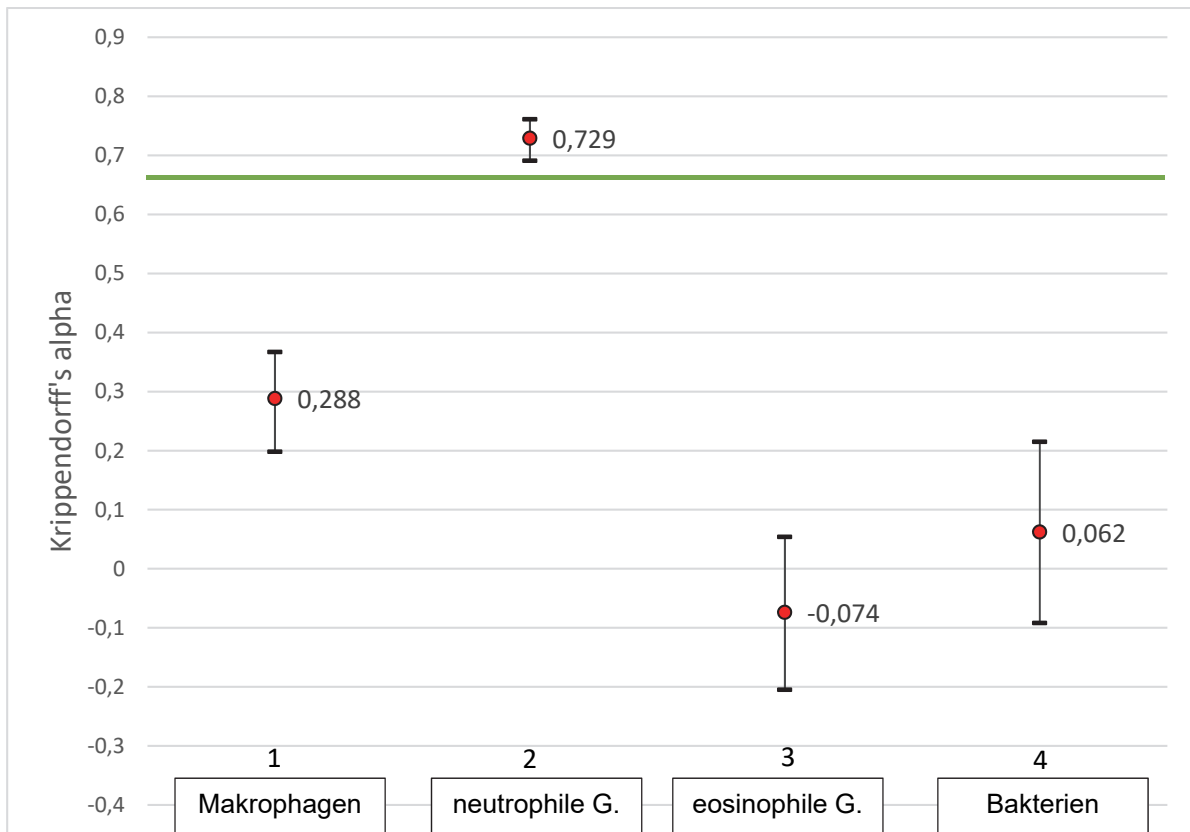


Abbildung 38: Interindividuelle Übereinstimmung der Ergebnisse aller 6 Labore für ausgewählte Parameter im TBS; roter Punkt stellt Krippendorff's alpha dar, zusätzlich ist das 95% Konfidenzintervall angegeben, Werte oberhalb der grünen Linie zeigen eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse an, große Konfidenzintervalle stellen eine große Varianz der Ergebnisse dar.

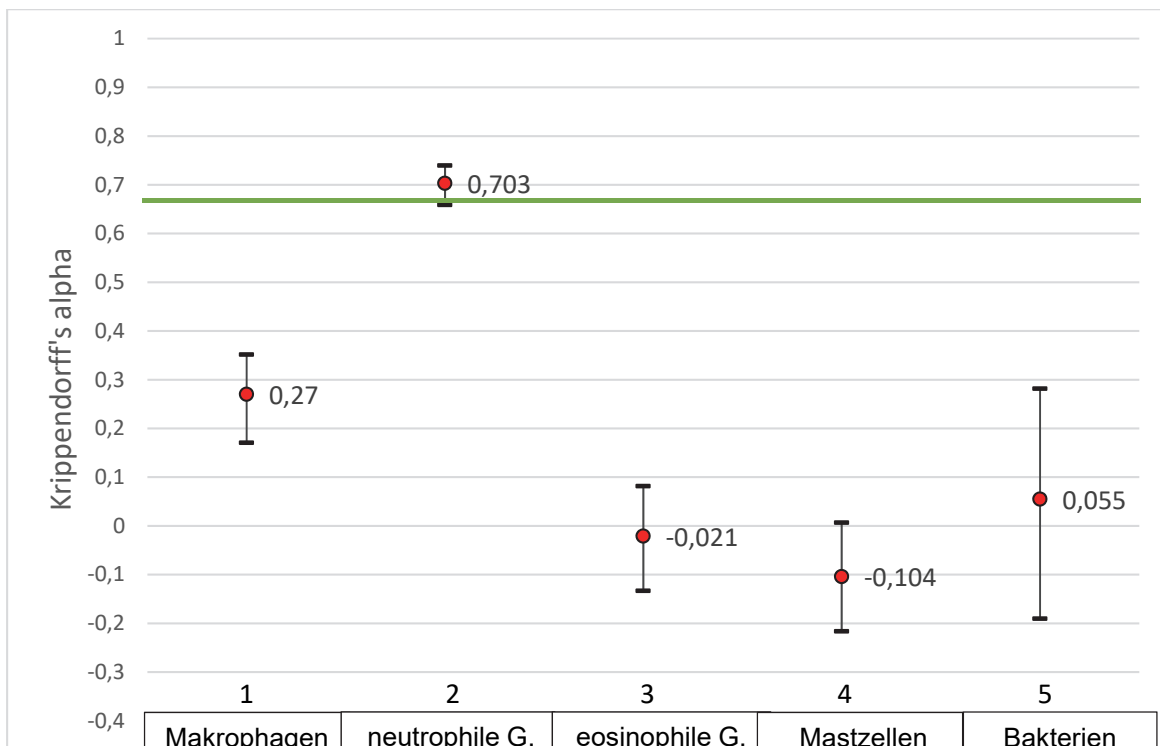


Abbildung 39: Interindividuelle Übereinstimmung der Ergebnisse aller 6 Labore für ausgewählte Parameter in der BAL; roter Punkt stellt Krippendorff's alpha dar, zusätzlich ist das 95% Konfidenzintervall angegeben, Erklärung s. Abb.38.

5.5 Ergebnisse zytologischer Diagnosen

Als letzter Teil des Vergleichs der zytologischen Untersuchung sollten die Diagnosen der verschiedenen Labore und Untersucher verglichen werden. Als Referenz- und in dieser Studie als „richtige“ Diagnose wird die angenommen, die im Rahmen der Atemwegsuntersuchung in der Klinik für Pferde gestellt wurde.

Aufgrund der vielfältigen Diagnosestellungen werden die Ergebnisse der Zytologie rein deskriptiv dargestellt. In den Tabellen 17-19 sind die Diagnosen aller Labore zu den ursprünglichen 15 Pferden aufgelistet. Bei allen 15 Pferden gab es durch die doppelt versandten Proben (Pferd a und b) nun zwei Diagnosen pro Labor. Insgesamt erhielt jedes Pferd durch die Befundung von vier Fremdlaboren und den zwei Untersuchern der Klinik für Pferde somit 12 Diagnosen. Zunächst sollen die Ergebnisse der Diagnosen von den Untersuchern der Klinik für Pferde und anschließend die Ergebnisse der Fremdlabore vorgestellt werden.

5.5.1 Ergebnisse der zytologischen Diagnosen durch die Untersucher der Klinik für Pferde

5.5.1.1 Lungengesunde Pferde

Insgesamt wurden fast alle Befunde der lungengesunden Pferde durch die verblindeten Untersucher A und B der Klinik für Pferde als lungengesund eingestuft. Beide Untersucher merkten bei einigen Befunden eine erhöhte Zelldichte in der BAL und im TBS bei den lungengesunden Pferden an, allerdings wurde die Zellverteilung der einzelnen Zellarten von Untersucher A als physiologisch eingestuft. Auch Untersucher B wies häufig auf die dominierende Zellart Makrophagen und den geringen Anteil oder das Fehlen neutrophiler Granulozyten hin. Die Befunde wiesen somit nicht auf eine Entzündungsreaktion hin. Untersucher B merkte zum Teil eine gestörte Clearance und eine erhöhte Aktivität der Makrophagen in Form von Phagozytose und schaumigem Aussehen in den Befunden an. Bei einigen Pferden wurde das vermehrte Vorkommen von Fremdmaterial und eine erhöhte Menge an Mukus angesprochen. Untersucher A gab ebenfalls bei einigen Proben eine geringgradig gestörte Clearance an. Diese Befunde wurden allerdings einer erhöhten Umweltbelastung und nicht equinem Asthma zugeordnet. Somit wurde die Pferde als gesund eingestuft.

Ausnahmen gab es z.T. bei den Pferden 2 und 3. Untersucher A gab aufgrund der Akkumulation von neutrophilen Granulozyten in Nestern im TBS bei Pferd 2a den Verdacht auf eine vorangegangene bakterielle Infektion an. Generell wurde dieses Pferd durch Untersucher A aber als gesund klassifiziert.

Untersucher B vermutete bei Pferd 3a equines Asthma in Remission aufgrund einer stark gestörten Clearance, mittelgradigen Mukusanteilen, Curschmannspiralen und wenigen

mehrkernigen und schaumigen Makrophagen. Pferd 3b wurde allerdings als lungengesund eingestuft. Pferd 3b wurde von Untersucher A als gesund eingestuft, dennoch war aufgrund der gestörten Clearance und erhöhten Zelldichte ein equines Asthma in Remission nicht auszuschließen. Die Zellverteilung war als physiologisch angegeben.

5.5.1.2 Pferde mit mildem-moderatem Asthma

Die Untersucher der Klinik für Pferde stellten die Diagnose equines Asthma beim Vorkommen einer neutrophilen Entzündung in der BAL und dem TBS, sowie bei Hinweisen auf eine Dys- und Hyperkrinie, einer Störung der mukoziliären Clearance und einer erhöhten Aktivität der Alveolarmakrophagen. Bei den neutrophilen Granulozyten gaben die Untersucher oft eine Hypersegmentierung der Zellen an. Untersucher A gab das Vorkommen von Becherzellen als ausgeprägte Dyskrinie an, die mit einer schlechteren Prognose einhergingen.

MEA und equines Asthma in Remission wurden bei beiden Untersuchern bei <25% neutrophilen Granulozyten in der BAL diagnostiziert, wie beispielsweise bei Pferd 7 (22,3%) und Pferd 9 (12,5%). Bei >25% neutrophile Granulozyten wurde der Verdacht auf SEA gestellt. Aus diesem Grund variierten die Diagnosen innerhalb und zwischen den Untersuchern abhängig vom Anteil der neutrophilen Granulozyten in der BAL und auch weiteren Befunden einer chronischen Entzündung.

Bei Pferd 6 wurde im Rahmen der Atemwegsuntersuchung equines Asthma in Remission festgestellt. Untersucher B vermutete bei Pferd 6a equines Asthma in Remission aufgrund einer Hyper- und Dyskrinie sowie einer gestörten Clearance im TBS und einer erhöhten Zelldichte und geringgradig erhöhten neutrophilen Granulozyten (5,25%). Bei den zweiten Proben dieses Pferdes (6b) stellte Untersucher B keine Auffälligkeiten fest, weswegen dieser Befund als lungengesund eingestuft wurde. Auch Untersucher A konnte bei Pferd 6 allein mit den zytologischen Befunden nicht zwischen gesund und equinem Asthma in Remission unterscheiden.

Auch die Unterscheidung zwischen MEA und equinem Asthma in Remission war den Untersuchern z.T. nicht möglich. Da sich die zytologischen Befunde sehr ähnlich darstellen, ist eine Unterscheidung zwischen MEA und equinem Asthma in Remission allein durch zytologische Befunde meist nicht möglich. Generell fiel auf, dass der Begriff equines Asthma in Remission nur von den Untersuchern der Klinik für Pferde verwendet wurde.

5.5.1.3 Pferde mit schwerem equinem Asthma

Untersucher A und B orientierten sich wie bereits erklärt an den Prozentwerten der neutrophilen Granulozyten in der BAL für die Diagnosestellung. Somit wurde bei >25%

Neutrophilen in der BAL SEA diagnostiziert. Hinzu kamen Hinweise auf eine gestörte Clearance, eine Dys- und Hyperkrinie und aktivierte Makrophagen als Zeichen einer chronischen Entzündung. Die Untersucher orientierten sich somit bei der Diagnosestellung an der Schwere der neutrophilen Entzündung, wodurch zwar bei allen Befunden equines Asthma diagnostiziert wurde, allerdings innerhalb und zwischen den Untersuchern unterschiedliche Diagnosen zum Schweregrad gestellt wurden.

5.5.2 Ergebnisse der zytologischen Diagnosen durch die Fremdlabore

5.5.2.1 Lungengesunde Pferde

Zusammenfassend fiel bei den zytologischen Diagnosen der Fremdlabore auf, dass bei vielen Befunden der lungengesunden Pferde eine Störung im Respirationstrakt diagnostiziert wurde. Dabei handelte es sich vor allem um eine erhöhte Phagozytose der Makrophagen, eine milde Hyper- oder Dyskrinie, Obstruktionsprozesse und/oder eine Störung der mukoziliären Clearance. Bei fast allen Pferden stellten die Labore vereinzelt oder geringgradig neutrophile Granulozyten bzw. <10% in der BAL und auch im TBS fest.

Eine Ausnahme gab es bei einem Befund von Labor 4, welches bei Pferd 2a 45% neutrophile Granulozyten in der Differentialzellzählung angab (nicht klar ob in der BAL oder TBS), sodass gleichermaßen Neutrophile und Makrophagen sowie verdichtete Sekretbeimengungen zu finden waren. Hier bestand der Verdacht auf eine schon länger bestehende infektiös verursachte Bronchitis, wobei angegeben wurde, dass wenn diese über mehrere Wochen besteht, zunehmend Makrophagen und Immunzellen nachgewiesen werden können. Dieses Labor empfahl daraufhin eine antibiotische Therapie. Bei Pferd 2b (Proben des gleichen Pferdes) konnte Labor 4 dagegen nur 8% neutrophile Granulozyten nachweisen, sodass es die Diagnose MEA erhielt.

Abgesehen von diesen Befunden äußerte kein Labor Hinweise auf purulente Entzündungen bei den anderen lungengesunden Pferden.

Labor 3 beschrieb die vermehrte Phagozytose von Pflanzenteilen und zum Teil vorkommenden Riesenzellen als eine chronische granulomatöse/makrophagenreiche Entzündung. Dieses Labor ordnete die Befunde einer Reizung des Respirationstraktes mit Pflanzenteilen und nicht equinem Asthma zu. Labor 3 bemerkte bei Pferd 4 bei beiden BAL Proben eine erhöhte Mastzellzahl von 5%, allerdings ohne eine Erhöhung der neutrophilen Granulozyten, weswegen hier ein MEA im inaktiven Stadium vermutet wurde.

Labor 1 äußerte bei manchen Proben mit erhöhter Phagozytoseaktivität die Vermutung, dass MEA vorliegen könnte. Bei anderen Proben wies es nur auf eine Störung im Respirationstrakt hin, ohne einen Verdacht auf MEA zu äußern. Dieses Labor betitelte nur die Befunde eines Pferdes als lungengesund.

Auch Labor 2 stellte unterschiedliche Verdachtsdiagnosen, sodass das zytologische Bild bei einigen Pferden als Normalbefund mit geringgradiger Hyper- und Dyskrinie angesehen wurde, bei anderen Pferden äußerte dieses Labor allerdings ebenfalls den Verdacht auf MEA aufgrund des zytologischen Bildes und der Zellzusammensetzung. Bei diesen Pferden wurde in der BAL und meist auch im TBS eine geringgradige Menge neutrophiler Granulozyten angegeben. Labor 2 vermutete, dass mehrkernigen Zellen entweder in Zusammenhang mit einer Virusgenese oder mit Fremdmaterial und einem chronischen Alveolarschaden stehen. Auch Labor 4 äußerte den Verdacht auf MEA aufgrund vermehrter Mengen an Mukus, einer erhöhten Anzahl an Makrophagen und zum Teil auch aufgrund abgestoßener respiratorischer Epithelien.

Bei einigen Proben gab es auch Differenzen zwischen den Befunden von TBS und BAL, sodass die Verdachtsdiagnosen anders ausgefallen wären, wenn nur eine Lungenprobe beurteilt worden wäre (Pferd 6a: Labor 1; Pferd 3a: Labor 2; Pferd 8a: Labor 5a).

Zusammenfassend fiel auf, dass einige Labore die erhöhte Phagozytose der Makrophagen, das Vorkommen mehrkerniger Zellen, eine Hyper- und Dyskrinie und eine Störung der mukoziliären Clearance trotz der fehlenden neutrophilen Entzündung in der BAL mit MEA in Verbindung setzten. Andere ordneten diese Auffälligkeiten einer Störung im Respirationstrakt und einer granulomatösen Entzündung anstatt equinem Asthma zu. Einige Pferde erhielten auch die Verdachtsdiagnose lungengesund. Insgesamt gab es Unterschiede in der Befundinterpretation innerhalb und zwischen den Laboren.

5.5.2.2 Pferde mit mildem bis moderaten equinem Asthma

Die meisten Labore stellten generell die Verdachtsdiagnose equines Asthma wie die Untersucher der Klinik für Pferde bei einer neutrophilen bzw. purulenten und pyogranulomatösen Entzündung, bei Hinweisen auf eine Dys- und Hyperkrinie, Obstruktionsprozessen und einer Störung der mukoziliären Clearance. Labor 1 beschrieb zusätzlich eine lymphatische Infiltration, welche für einen chronischen Prozess spricht.

Labor 1 gab fast bei allen Proben an, dass es sich um equines Asthma handelte, legte sich allerdings in den seltensten Fällen auf den Schweregrad der Erkrankung fest.

Labor 4 vermutete equines Asthma bei Anzeichen einer chronischen Entzündung, welche durch erhöhte Mengen an Mukus, eine erhöhte Anzahl an Immunzellen, Makrophagen (Pferd 8a 60%), einem erhöhten Zellgehalt und dem Vorkommen unreifer (regenerierter) respiratorischer Epithelien gekennzeichnet waren. Eine starke Vermehrung unreifer respiratorischer Epithelien wies auf SEA hin.

Die Verdachtsdiagnosen für Pferd 11 fielen insgesamt ähnlich aus (equines Asthma und SEA), nur Labor 4 äußerte den Verdacht einer bakteriellen Infektion. Es gab an, dass es bei Pferd 11a zum Austritt von Fibrin und neutrophilen Granulozyten auf die Schleimhautoberfläche im Rahmen einer bakteriellen Infektion gekommen sei. Diese seien als flockige Verdichtungen im Sekret zu finden. Das Zellbild dieses Pferdes wies keine Vermehrung von Immunzellen oder eosinophiler Granulozyten und keine Anzeichen einer verstärkten Zellregeneration der terminalen Bronchien auf, daher wurden eine allergisch ausgelöste Bronchitis und eine chronische Erkrankung ausgeschlossen. Ebenso verhielt es sich bei Pferd 11b. Labor 4 erklärt, dass bei Patienten mit eitriger Bronchitis, die einige Wochen besteht oder rezidivierend ist, die dabei entstehenden Entzündungsprodukte die zellulären Veränderungen der häufig als Grunderkrankung vorliegenden chronischen Bronchitis überlagern. Dieses Labor vermutete nur bei Pferd 11a das Bestehen von SEA im Hintergrund, bei Pferd 11b gebe es dafür allerdings keine Hinweise.

Bei Pferd 6 (equines Asthma in Remission) wurden gemischte Verdachtsdiagnosen gestellt. Labor 1 gab an, dass nur das TBS bei Pferd 6a Hinweise auf equines Asthma gebe, die BAL allerdings nicht. Auch Pferd 6b zeige keine purulenten Entzündungsprozesse, allerdings eine Störung der mukoziliären Clearance, Hinweise auf Bronchospasmus und eine erhöhte Phagozytose. Auch Labor 3 war sich uneinig bei der Diagnose, sodass es bei Pferd 6a aufgrund der erhöhten Anzahl an Lymphozyten in der BAL (72%) eine chronische immunologische Situation vermutet wurde, wobei eine virale Infektion in Frage kam. Das TBS wurde hier als unauffällig eingestuft. Pferd 6b ordnete dieses Labor dagegen MEA aufgrund erhöhter Mengen an Mukus, Curschmannspiralen und feinvokulisierten Makrophagen zu. Labor 4 teilte die Verdachtsdiagnose von MEA bei diesem Pferd aufgrund der erhöhten Anzahl an Makrophagen und bei Pferd 6b auch an Lymphozyten. Es fiel allerdings auf, dass Labor 4 bei Pferd 6a nur 8% Lymphozyten im Ausstrich angab und bei Pferd 6b dagegen 51% Lymphozyten. Der Begriff equines Asthma in Remission wurde von keinem Fremdlabor benutzt.

Beim Vergleich der Verdachtsdiagnosen von Pferd 8 fiel auf, dass Labor 1 einmal eine purulente Entzündung und damit equines Asthma diagnostizierte, bei den zweiten Proben dieses Pferdes allerdings keine purulente Entzündung festgestellt werden konnte (Pferd 8b). Labor 2 beobachtete bei Pferd 8b eine mittelgradige Anzahl an neutrophilen Granulozyten und eine Dyskrie in der BAL, sodass SEA vermutet wurde. Das Zellbild der zweiten Proben dieses Pferdes (8a) war dagegen nicht typisch für equines Asthma und zeigte nur eine mittelgradige Makrophagenproliferation. Labor 3 wies bei Pferd 8 in der Differentialzellzählung bei den neutrophilen Granulozyten ebenfalls deutliche Unterschiede auf, welche zu

unterschiedlichen Verdachtsdiagnosen für das gleiche Pferd führten. Bei Pferd 8a erschien die BAL mit nur 8% Neutrophilen physiologisch, nur das TBS ließ durch eine geringgradige bis mittelgradige purulente Entzündung equines Asthma vermuten. Die Untersuchung der zweiten Proben desselben Pferdes (8b) ergaben bei Labor 3 46% neutrophile Granulozyten in der BAL, reichlich Mukus, Curschmannspiralen und schaumige Makrophagen weswegen der Verdacht auf SEA bestand.

Weitere Differenzen gab es bei den Verdachtsdiagnosen bei Pferd 7 und Labor 2, da einmal eine dominierende Anzahl neutrophiler Granulozyten (7a) und das andere Mal (7b) nur vereinzelt neutrophile Granulozyten nachgewiesen werden konnten. So wurde bei einem Pferd SEA und bei dem anderen Pferd (Proben des gleichen Pferdes) nur eine geringgradige Makrophagenproliferation und eine Störung im Respirationstrakt festgestellt.

Nur Labor 4 stellte bei Pferd 9a aufgrund einer Zählung von 88% neutrophiler Granulozyten im Ausstrich (unklar ob TBS oder BAL) und bakterienverdächtigen Erregerstrukturen in den Leukozyten die Verdachtsdiagnose einer bakteriellen Bronchitis. Es konnten zwar aktivierte Makrophagen und Lymphozyten festgestellt werden, allerdings gab es keine Hinweise auf eine chronische Erkrankung (s.o.). Bei Pferd 9b wurden dagegen nur 44% neutrophile Granulozyten nachgewiesen, sodass hier SEA mit einer bakteriellen Sekundärinfektion vermutet wurde. Auch hier merkt das Labor an, dass durch die zytologischen Befunde allein oft nicht entschieden werden kann, ob eine primäre Infektion oder SEA mit einer sekundären Infektion vorliegt.

Zusammenfassend gab es in dieser Gruppe einige Variationen der Verdachtsdiagnosen. Es wurde meist der Verdacht auf equines Asthma geäußert, allerdings unterschied sich häufig der Schweregrad der Erkrankung zwischen und innerhalb der Labore. Ausnahmen stellten außerdem die Verdachtsdiagnosen von Labor 4 dar.

5.5.2.3 Pferde mit schwerem equinem Asthma

Bei den Verdachtsdiagnosen der Labore zu den Pferden mit SEA handelte es sich fast immer um equines Asthma, wobei Labor 1 und 3 oft keine Unterscheidung des Schweregrades machten, sondern auf eine Korrelation mit den klinischen Symptomen zur Diagnosestellung hinwiesen. Labor 2 gab bei den Befunden der Pferde mit SEA eine mittelgradige, hochgradige und dominierende Anzahl an neutrophilen Granulozyten an. Auch Labor 1 sprach von mittelgradig pyogranulomatösen, geringgradig und hochgradig purulenten Entzündungen zusammen mit einer geringgradigen bis mittelgradigen lymphatischen Infiltration, sowie weiteren Befunden, die hinweisend auf equines Asthma sind (s. Kap. 5.5.2.).

Ausnahmen bei den Verdachtsdiagnosen gab es bei Labor 1 in der Beurteilung der Proben von Pferd 10b, bei dem lediglich angegeben wurde, dass in der BAL eine geringgradige lymphozelluläre Entzündung vorliege, die Hinweise auf eine chronisch immunologische Situation, z.B. einen chronischen Entzündungsprozess, gebe. Außerdem würden in der BAL nur wenige bis einige neutrophilen Granulozyten vorliegen. Die zweiten Proben des gleichen Pferdes (10a) zeigten dagegen ein purulentes Geschehen mit einer Störung der mukoziliären Clearance und Obstruktionsprozessen, sodass hier equines Asthma diagnostiziert wurde.

Darüber hinaus äußerte Labor 3 bei allen Proben von Pferd 12 den Verdacht auf MEA zusammen mit einer bakteriellen Sekundärinfektion aufgrund von degenerierten neutrophilen Granulozyten und intra- und extrazellulär liegenden kokkoiden Bakterien im TBS, bei einer Probe auch in der BAL. Dieses Labor gab den Grenzwert >10% neutrophilen Granulozyten für das MEA an und wies darauf hin, dass bei passenden klinischen Symptomen auch schweres equines Asthma bestehen könne. Auch hier wies eine neutrophile zum Teil auch granulomatöse Entzündung auf equines Asthma hin. Der Funktionszustand der neutrophilen Granulozyten sowie intrazelluläre Bakterien wiesen auf eine bakterielle Infektion hin.

Labor 4 vermutete unter anderem bei Pferd 13b dagegen eine bakterielle Infektion aufgrund der überwiegend neutrophilen Entzündung und nur wenigen Makrophagen und Lymphozyten. Weil kaum aktivierte Makrophagen und unreife Epithelien vorkamen, wurde equines Asthma ausgeschlossen. Bei den zweiten Proben dieses Pferdes (13a) wurde dagegen auch eine vermehrte Anzahl an Makrophagen und unreifen respiratorischen Epithelien gefunden, wodurch der Verdacht auf eine chronische Bronchitis und somit auf SEA entstanden ist. Auf das Vorhandensein von intrazellulären Bakterien wurde hier nicht eingegangen. Labor 4 vermutete bei Pferd 14b aufgrund einer relativ starken Akkumulation an neutrophilen Granulozyten (29%) eine frische Entzündung verursacht durch eine bakterielle Sekundärinfektion. Pferd 14a wies nur 11% neutrophile Granulozyten auf und hatte daher keine Anzeichen einer sekundären bakteriellen Infektion. Bei Pferd 15a konnte Labor 4 ebenfalls keine Hinweise auf ein chronisches Geschehen finden, da keine Vermehrung unreifer respiratorischer Epithelien vorlag. Für eine Infektion mit bakteriellen Erregern sprach der hohe Gehalt an neutrophilen Granulozyten und die in einzelnen Makrophagen und Granulozyten enthaltenen kokkenartigen Erreger. Ebenso verhielt es sich bei den zweiten Proben dieses Pferdes (15b), wobei hier zusätzlich das Fehlen einer stärkeren Zunahme an Immunzellen und eosinophilen Granulozyten aufgeführt wurde und zum Ausschluss des SEA führte.

Bei den Pferden mit mildem bis moderaten und schweren equinen Asthma orientierte sich der Großteil der Labore bei der Schwere der Erkrankung an der Anzahl neutrophiler Granulozyten. Häufig wurde bei dem Verdacht auf equines Asthma auch eine pyogranulomatöse Entzündung

und eine lymphatische Infiltration beschrieben. Labor 4 vermutet equines Asthma bei einem chronischen Krankheitsgeschehen mit gleichzeitiger Erhöhung neutrophiler Granulozyten, Makrophagen und Immunzellen (Lymphozyten). Der Verdacht läge somit vor, wenn reichlich Immunzellen, unreife respiratorische Epithelien und schleimartige Substanzen vorkommen. Hohe Gehalte an neutrophilen Granulozyten wurden hier eher mit einer bakteriellen Infektion in Verbindung gebracht. Das Vorhandensein von Bakterien wurde in diesem Zusammenhang nicht immer angesprochen oder mit einzelnen intrazellulären Bakterien angegeben. Auch auf den Funktionszustand der neutrophilen Granulozyten ist Labor 4 bei der Befundinterpretation nicht eingegangen. Bei manchen Befunden, die die Verdachtsdiagnose eitrige Bronchitis durch virulente bakterielle Erreger angaben, wurde die Differentialdiagnose equines Asthma aufgeführt, allerdings wiesen die meisten Befunde keine Hinweise auf ein chronisches Geschehen auf. Bei diesen Befunden wurde eine antibiotische Therapie empfohlen.

Ergebnisse

Tabelle 17: Diagnosen für die lungengesunden Pferde, RT: Respirationstrakt, EA: equines Asthma; MEA: mildes-moderates equines Asthma; SEA: schweres equines Asthma.

Pferd	Diagnose	Labor 1	Labor 2	Labor 3	Labor 4	Labor 5a	Labor 5b
1a	gesund	evtl. MEA, Störung im RT	mildes EA	kein EA, ggr. Störung im RT	MEA	gesund, ggr. Hyperkrinie	gesund
1b		evtl. MEA, Störung im RT	mildes EA	kein EA, ggr. Störung im RT	MEA	gesund	gesund
2a	gesund	Störung im RT	gesund, ggr. Hyper-/Dyskrinie	kein EA, ggr. Störung im RT	bakterieller Infekt, evtl. sekundär EA	gesund, evtl. Zustand nach bakterieller Infektion	gesund
2b		evtl. MEA, Störung im RT	evtl. EA	kein EA, ggr. Störung im RT	MEA	gesund	gesund
3a	gesund	evtl. MEA, Störung im RT	MEA (BAL), gesund (TBS)	kein EA, ggr. Störung im RT	MEA	gesund, ggr. Dyskrinie	MEA in Remission
3b		Störung im RT	MEA	kein EA, ggr. Störung im RT	MEA	gesund, evtl. EA in Remission	gesund
4a	gesund	gesund	keine Verdachtsdiagnose, untypisch für EA	MEA im inaktiven Stadium	MEA	gesund, Hyperkrinie	gesund
4b		Störung im RT	gesund	MEA im inaktiven Stadium	MEA	gesund	gesund
5a	gesund	Störung im RT	gesund, ggr. Hyper-/Dyskrinie	gesund, evtl. MEA	MEA	gesund	gesund
5b		Störung im RT	gesund	gesund	MEA	gesund	gesund

Ergebnisse

Tabelle 18: Diagnosen für Pferde mit MEA, RT: Respirationstrakt, EA: equines Asthma; MEA: mildes-moderates equines Asthma; SEA: schweres equines Asthma.

Pferd	Diagnose	Labor 1	Labor 2	Labor 3	Labor 4	Labor 5a	Labor 5b
6a	EA in Remission	Verdacht auf EA (TBS); kein EA (BAL)	evtl. MEA, Hyper-/Dyskrie	evtl. virale Infektion (BAL); unauffällig (TBS)	MEA	gesund oder EA in Remission	SEA in Remission
6b		kein purulenter Prozess, Störung im RT	keine Verdachtsdiagnose, kein SEA	MEA	MEA	gesund oder MEA in Remission	lungengesund
7a	MEA	EA	SEA	EA	MEA	MEA oder SEA in Remission	SEA
7b		MEA	kein akuter Schub EA, ggr. Makrophagenproliferation, Störung im RT	EA	MEA	MEA oder SEA in Remission	SEA in Remission
8a	MEA	EA	mgr. Makrophagenproliferation, nicht typisch für EA	evtl. EA, BAL physiologisch	MEA; evtl bereits SEA	gesund (BAL) oder MEA (TBS)	MEA
8b		keine purulenten Prozesse, erhöhte Phagozytose	SEA	SEA	SEA	MEA	MEA
9a	MEA	EA	SEA	EA wahrscheinlich SEA	bakterielle Bronchitis	SEA in Remission oder MEA	SEA
9b		EA	SEA	MEA	SEA mit sekundärem bakteriellem Infekt oder primäre Bronchitis	SEA mit ausgeprägter Dyskrie	MEA
11a	MEA, zytologisch SEA	EA	SEA	SEA	bakterielle Bronchitis, SEA im Hintergrund		SEA
11b		EA	SEA	SEA	bakterielle Bronchitis		SEA

Ergebnisse

Tabelle 19: Diagnosen für Pferde mit SEA, RT: Respirationstrakt, EA: equines Asthma; MEA: mildes-moderates equines Asthma; SEA: schweres equines Asthma.

Pferd	Diagnose	Labor 1	Labor 2	Labor 3	Labor 4	Labor 5a	Labor 5b
10a	SEA	EA	SEA	EA wahrscheinlich SEA	bakterielle Bronchitis	MEA	SEA
10b		chronisch immunologische Situation	SEA	EA wahrscheinlich MEA	EA mit bakterieller Sekundärinfektion	MEA	MEA
12a	SEA	EA	SEA	MEA, Verdacht auf bakterielle Sekundärinfektion	SEA	SEA	SEA in Remission
12b		EA	SEA	MEA, Verdacht auf bakterielle Sekundärinfektion	MEA, Verdacht auf bakterielle Sekundärinfektion	MEA oder SEA am Übergang zur Remission	MEA
13a	SEA	EA	SEA	EA wahrscheinlich SEA	SEA	EA in Remission	SEA
13b		EA	SEA	EA wahrscheinlich MEA	bakterielle Bronchitis	MEA oder SEA in Remission	MEA
14a	SEA	EA	SEA	SEA	EA	MEA oder SEA in Remission	MEA
14b		EA	SEA	SEA	EA mit bakterieller Sekundärinfektion	SEA	SEA
15a	SEA	MEA	SEA	EA	bakterielle Bronchitis	SEA + MEA eosinophile Subform	SEA
15b		EA	SEA	EA, Verdacht auf bakterielle Sekundärinfektion im OAT	bakterielle Bronchitis	SEA	SEA

6 Diskussion

6.1 Diskussion über Einflüsse auf die zytologischen Ergebnisse

Ziel dieser Studie war der intra- und interindividuelle Vergleich der zytologischen Untersuchung von TBS und BAL des gleichen Pferdes durch Fremdlabore sowie klinikinterne Untersucher. Unterschiede in den zytologischen Ergebnissen von TBS und BAL eines Pferdes können zum einen durch die Probenentnahme und -bearbeitung und zum anderen durch die mikroskopische Untersuchung der zytologischen Ausstriche und die Interpretation der Befunde auftreten. Folgende Parameter können Einfluss auf die zytologischen Ergebnisse haben: Lungenseite, Tiefe der Probenentnahme, instilliertes Volumen, Separieren oder Poolen von Aliquoten, Temperatur der Flüssigkeit bei der Instillation, Filtrierung der Proben, Zentrifugation, Lagerungszeit, Ausstrichtechnik, Zellzählung, Identifikation der Zellen (Depecker et al. 2014; Hoffman und Viel 1997; Jean et al. 2011; Mair et al. 1987; Orard et al. 2016; Pickles et al. 2002a; Pickles et al. 2002b; Pickles et al. 2002c; Wenisch et al. 2001).

6.1.1 Diskussion über die Probenentnahme

In der Literatur sind verschiedene Protokolle zur Entnahme von TBS und BAL beschrieben (s. Kap. 2.7.1.2 und 2.7.1.3). Besonders bei der Durchführung der BAL gibt es Potential für Variationen in der Durchführungstechnik (s.o.).

Die Probenentnahme des TBS erfolgte in der aktuellen Studie bei allen Pferden identisch über einen Katheter im Arbeitskanal des Endoskops. Bei einigen der als gesund eingestuften Pferde musste eine Trachealspülprobe durchgeführt werden, da kein oder nur sehr wenig Trachealsekret vorlag. Dies wurde ebenfalls einheitlich mit 20ml steriler Kochsalzlösung durchgeführt, was allgemeinen Empfehlungen entspricht und kein Potential für Variationen in der Zytologie bietet (Couetil und Thompson 2020a).

Auch die Durchführung der BAL erfolgte in dieser Studie nach allgemeinen Vorgaben (Couetil et al. 2016; Couetil und Thompson 2020a; Robinson 2001). Jedes Pferd wurde einmalig beprobt und die BAL bei allen Pferden identisch durchgeführt. Die Anfertigung der Ausstriche eines Pferdes erfolgte aus dieser einmaligen Probenentnahme, weswegen verschiedene Entnahmeprotokolle in der aktuellen Studie keinen Einfluss auf die zytologischen Ergebnisse unterschiedlicher Labore haben können.

6.1.2 Diskussion der Probenbearbeitung

Die Probenbearbeitung erfolgte innerhalb der Probenart (TBS oder BAL) identisch bis zur Färbung der Ausstriche.

Die Möglichkeit zur Anfertigung von Zytospinpräparaten wurde von einem Labor angegeben, allerdings wäre dafür ein sofortiger, gekühlter Transport der nativen BAL in das Labor notwendig gewesen. Da die Proben allerdings nicht zum gleichen Zeitpunkt im Labor ankommen sollten und eine einheitliche Probenbearbeitung für alle Labore erfolgen sollte, wurde auf die Anfertigung von Zytospinpräparaten verzichtet.

Einige Studien beschäftigten sich mit der Reproduzierbarkeit der zytologischen Ergebnisse in Bezug auf die Zellzählung in der BAL (s. Kap. 6.2.) (De Lorenzi et al. 2009; Hansen et al. 2019; Warke et al. 2001; Wasko et al. 2011). In allen diesen Studien wurden dafür Zytospinausstriche untersucht und die gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zum Teil auf die gleichmäßige Zellverteilung und die besseren morphologischen Ergebnisse, die bei der Zytozentrifugation entstehen, zurückgeführt. Folglich hätte in dieser Studie eine einheitliche Anfertigung von Zytospinpräparaten eventuell zu gleichmäßigeren Zellverteilungen und so zu einheitlicheren Differentialzellzählungen und Diagnosestellungen geführt. Eine Zytozentrifuge stand der Klinik für Pferde und steht vielen Kliniken und tierärztlichen Praxen allerdings nicht zur Verfügung.

Unterschiede in der Zytologie können in dieser Studie bei der Bearbeitung vor allem auf das Ausstreichen der Proben zurückgeführt werden. Es wurde beschrieben, dass die Ausstrichmethode eine schlechtere Zellmorphologie mit kleineren und dunkler gefärbten Zellen hervorbringt, was die Identifikation besonders kleinerer Zellen im Vergleich zu Zytospinpräparaten erschwert (Pickles et al. 2002b). Ebenso führt das manuelle Ausstreichen der Probe zu einer heterogenen Verteilung der Zellen auf dem Objektträger und es kann zu einer vermehrten Zelllyse kommen (Dehard et al. 2008). Folglich kann es in dieser Studie vor allem bei viskösen Proben zu einer ungleichmäßigen Zellverteilung auf den Objektträgern gekommen sein. Da jedes Labor von jedem Pferd einen eigenen Ausstrich von TBS und BAL erhalten hat, können die Unterschiede in der Differentialzellzählung und in der Diagnosestellung unter anderem auf die Zellverteilung und auch die ungleichmäßige Verteilung weiterer Substanzen wie z.B. Fremdmaterial, Curschmannspiralen und Bakterien zurückzuführen sein.

In dieser Studie wurden die Ausstriche von TBS und BAL luftgetrocknet und ungefärbt an die Labore geschickt. Da die aufgeteilten Ausstriche eines Pferdes nicht zur gleichen Zeit in den Laboren ankommen sollten, wurden einige Ausstriche zeitverzögert verschickt (max. 2 Tage). Es wurde beschrieben, dass die Lagerung unfixierter Ausstriche bis zu 2 Wochen möglich ist, daher kann die kurze Zeitverzögerung beim Versand mancher Ausstriche von maximal 2 Tagen, keinen Einfluss auf die morphologische Qualität und Anfärbbarkeit der Zellen gehabt haben (Binder et al., 2012).

Die Labore benutzen ihre eigenen laborinternen Färbungen, sodass die Färbung einen Einfluss auf die unterschiedlichen zytologischen Ergebnisse eines Pferdes zwischen den Laboren haben könnte. Die in zwei Laboren verwendete Diff-Quik Färbung soll nicht geeignet für die Darstellung und Differenzierung von Mastzellen sein und kann daher zu Unterschieden in der Mastzellzählung geführt haben (Hughes et al. 2003; Xaubet et al. 1991). Die genutzten Färbungen der anderen Labore ermöglichen eine Identifikation von Mastzellen (s. Kapitel 2.7.2.4.).

Die Labore gaben bei wenigen Pferden grenzwertig oder erhöhte Werte an Mastzellen ($\geq 5\%$) an, allerdings erfolgte dies nicht einheitlich für die gleichen Pferde.

Insgesamt wurden selten erhöhte Zahlen an Mastzellen bei den Studienpferden angegeben, was zum einen an der mangelhaften Identifikation bedingt durch die Färbung, einer nicht ausreichenden Anzahl an gezählten Zellen (s. Kapitel 2.7.3.) oder auch an dem höheren Alter der Studienpferde liegen kann (8-21 Jahre). In diesem Alter tritt häufiger der neutrophile Subtyp vom MEA oder auch SEA auf. Erhöhte Mastzellzahlen finden sich eher bei jüngeren Pferden (Couetil und Ward 2003; Ivester et al. 2018; Lavoie et al. 2011).

Somit sind die Ausstrichtechnik und die Färbung der Proben die einzigen Parameter der Bearbeitung, die in dieser Studie zu Unterschieden in den zytologischen Ergebnissen zwischen und innerhalb der Labore geführt haben können.

6.1.3 Diskussion über weitere Einflüsse

Die in Kapitel 2.7.5 aufgeführten und im Folgenden besprochenen Einflüsse auf die zytologischen Ergebnisse wie Alter, Haltung, Klima, vorherige Belastung, wiederholte Probennahme oder längerer Transport haben keinen Einfluss auf die Reproduzierbarkeit der zytologischen Ergebnisse eines Pferdes in dieser Studie, allerdings können sie für die Ergebnisse innerhalb der Gruppen oder für Verlaufsuntersuchungen eines Pferdes relevant sein.

Es wurde beschrieben, dass eine wiederholte Probenentnahme innerhalb von 24-48 Stunden und eine Belastung 1-2 Stunden vor der Entnahme zu einer erhöhten Anzahl an neutrophilen Granulozyten in der BAL und im TBS führen können (Malikides et al., 2007; Sweeney et al., 1994). In einer weiteren Studie kam es dagegen nach wiederholter Probenentnahme von TBS und BAL nach ≥ 24 Stunden zu keinen zytologischen Veränderungen (Tee et al., 2012).

Die wiederholte Probenentnahme und eine Belastung 1-2 Stunden vor der Entnahme können in dieser Studie keine Rolle gespielt haben, da kein Pferd am Tag der Probenentnahme belastet oder einige Tage zuvor bereits beprobt wurde. Sollte allerdings ein Pferd vor der Probenentnahme belastet worden sein, sollte dies bei Verlaufsuntersuchungen identisch

erfolgen, um eine mögliche Erhöhung der neutrophilen Granulozyten in Vergleich zu der vorherigen Untersuchung einschätzen zu können.

Der Einfluss von Belastung in kalter Luft auf die Zytologie der BAL wurde in einer Studie untersucht, wobei die BAL 24 und 48 Stunden nach der Belastung der Pferde durchgeführt wurde (Davis et al. 2007). Die Belastung bestand aus jeweils 5 Minuten Schritt, Trab und Galopp in kalter (-5°C) und warmer (25°C) Luft. 24 Stunden nach der Belastung kam es zu einer signifikanten Erhöhung der neutrophilen Granulozyten in kalter Luft (15,9% ± 8,2) im Vergleich zu warmer Luft (11,0% ± 5,6), allerdings war der Unterschied nach 48 Stunden nur noch gering (kalte Luft: 7,1 ± 8,0%, warme Luft: 6,4 ± 4,7%) (Davis et al. 2007). Die Erhöhung der Neutrophilen ist in dieser Studie zwar signifikant, allerdings ist die klinische Relevanz fraglich. Vermutlich ist eine Erhöhung der neutrophilen Granulozyten für die Differenzierung zwischen gesunden und gering bis mittelgradig erkrankten Pferden relevant. Die Probenentnahme in der aktuellen Studie erfolgte von April bis November. Nur die Untersuchung eines Pferdes erfolgte im Januar, weswegen bei diesem Pferd eine Belastung wie beschrieben in kalter Luft 1-2 Tage vor der Probenentnahme nicht ausgeschlossen werden kann. Da das im Januar beprobte Pferd (Pferd 15) eine hochgradige Neutrophilie in der BAL aufwies, kann der Einfluss der Belastung in kalter Luft allerdings vernachlässigt werden, da der Einfluss der Temperatur auf die neutrophilen Granulozyten im Vergleich zur massiven Neutrophilie dieses Pferdes nur marginal gewesen sein kann.

Das Alter kann ebenfalls Einfluss auf die zytologischen Ergebnisse haben. Wie in Kapitel 2.7.5. erklärt, kann bei Pferden, die über 10 Jahre alt sind, der Anteil an neutrophilen Granulozyten und bei Pferden, die über 20 Jahre alt sind, der Anteil der Lymphozyten in der BAL und im TBS erhöht sein (Hoffman 1999; Pacheco et al. 2014; Widmer et al. 2009). Das Alter kann auch in dieser Studie Einfluss auf die Zytologie genommen haben, da 12 Pferde ≥ 10 Jahre alt waren, allerdings hat dieser Einfluss ebenfalls keine Relevanz für die Reproduzierbarkeit der zytologischen Ergebnisse eines Pferdes und ist höchstens für die Diagnosestellung älterer und besonders gesunder Pferde relevant.

Ein längerer Transport kann nach 12 bzw. 24 Stunden zu einer Erhöhung der neutrophilen Granulozyten und der Anzahl an Bakterien im TBS führen (Racklyeft und Love 2006; Raidal et al. 1997). In dieser Studie wurden Pferde aus der näheren Umgebung untersucht und kein Pferd hatte eine vergleichbar lange Anreise. Dies sollte allerdings ebenfalls für Verlaufsuntersuchungen beachtet werden.

Die Aufstallung kann besonders bei Pferden mit equinem Asthma zu erhöhten Werten an neutrophilen Granulozyten in der BAL führen. Der Einfluss auf gesunde Pferde wird unterschiedlich beschrieben (s. Kapitel 2.7.5.) (F. J. Derksen, 1985; Robinson et al., 2003; Tremblay et al., 1993). In dieser Studie wurden Pferde aus unterschiedlichen Haltungssystemen beprobt, sodass ein Einfluss der Haltung auf die zytologischen Ergebnisse

innerhalb der Gruppen möglich ist. Bei Verlaufsuntersuchungen sollten daher von einer Aufstallung des Pferdes vor der Probenentnahme abgesehen werden, um diesen Einfluss auf die zytologischen Ergebnisse zu vermeiden.

Besonders bei wiederholter Atemwegsuntersuchung sollte darauf geachtet werden ein einheitliches Protokoll der Probenentnahme und -bearbeitung zu verwenden, um keine Veränderungen des zytologischen Bildes zu verursachen. Da die weiteren genannten Parameter ebenfalls Einfluss auf die zytologischen Ergebnisse haben können, sollte auf einheitliche Umwelteinflüsse vor der Probenentnahme geachtet werden, um eine valide zytologische Verdachtsdiagnose zu erhalten.

6.2 Diskussion über die intraindividuelle Varianz zytologischer Ergebnisse

Die Ausstriche eines Pferdes wurden in der aktuellen Studie doppelt verblindet durch jedes der Fremdlabore und die zwei Untersucher der Klinik für Pferde beurteilt, wodurch die intraindividuelle Varianz der zytologischen Ergebnisse des gleichen Pferdes untersucht werden konnte. Die verschiedenen Labore gaben zu den beurteilten zytologischen Parametern entweder genaue quantitative Werte (Prozentwerte) oder subjektive Schätzungen der Menge an (semiquantitative Angaben).

Im Folgenden werden die Durchführung und die Ergebnisse einiger Studien, die sich mit der intra- und interindividuellen Reproduzierbarkeit der Differentialzellzählung der BAL vor allem in Bezug auf die Anzahl der gezählten Zellen ebenso wie auf die Färbung der Ausstriche beschäftigen, mit der aktuellen Studie verglichen.

Bei den genannten Studien wurden einheitlich Zytopinausstriche aus BAL-Proben angefertigt und meist durch zwei oder drei verblindete, trainierte Untersucher beurteilt (De Lorenzi et al. 2009; Hansen et al. 2019; Warke et al. 2001; Wasko et al. 2011). Es wurden immer 100-500 Zellen ausgezählt und quantitative Werte (Prozentangaben) zu den Zellarten der Differentialzellzählung angegeben. Die Studienpopulation dieser Studien waren z.T. deutlich größer als in der aktuellen Studie (15 Studienpferde) und umfassten 40, 43, 68 und 167 Proben (De Lorenzi et al. 2009; Hansen et al. 2019; Warke et al. 2001; Wasko et al. 2011). In den genannten Studien wurde die zytologische Untersuchung in der gleichen Institution und immer auf die gleiche Art und Weise (Zellzählung und Prozentangaben zur Differentialzellzählung) durchgeführt. Die aktuelle Studie basierte im Vergleich auf den laborinternen Protokollen zur zytologischen Untersuchung, sodass manche Labore ebenfalls eine Zellzählung vornahmen und Prozentangaben machen, andere dagegen eine subjektive Schätzung der Menge einer Zellart machten. So erfolgte die zytologische Auswertung z.T. anders als in den genannten Studien. Die aktuelle Studie hätte wahrscheinlich mit einer größeren Studienpopulation und einer einheitlichen Befundung von verschiedenen Laboren (Zellzählung) ebenfalls eine

insgesamt bessere intraindividuelle Übereinstimmung bei allen Laboren erzielt. In der aktuellen Studie wurden die Ausstriche im Vergleich zu den genannten Studien manuell angefertigt. Zytopinsausstriche hätten in der aktuellen Studie die Übereinstimmung der Ergebnisse wahrscheinlich ebenfalls verbessert.

Als Maß der Übereinstimmung bzw. Reproduzierbarkeit wurden in den genannten Studien ähnlich wie in der aktuellen Studie der ICC und Lin's Konkordanz Koeffizient berechnet und die Kappa Statistik genutzt (De Lorenzi et al. 2009; Hansen et al. 2019; Warke et al. 2001; Wasko et al. 2011).

In einer der Studien wurde bei einer Zählung von 500 Zellen akzeptable interindividuelle Übereinstimmungen (ICC >0,85) für Makrophagen, Lymphozyten und neutrophile Granulozyten durch die Beurteilung von zwei Untersuchern erreicht (Hansen et al. 2019). Eine nicht mehr akzeptable interindividuelle Übereinstimmung wurde bei den eosinophilen Granulozyten (ICC 0,17) und bei Mastzellen (ICC 0,76) erreicht (Hansen et al. 2019). Eine Studie zur BAL beim Hund gab an, bei einer Zählung von 200 Zellen bereits eine hohe Reproduzierbarkeit (ICC >0,9) für neutrophile Granulozyten, Alveolarmakrophagen und eosinophile Granulozyten zu erreichen (De Lorenzi et al. 2009). Die Reproduzierbarkeit der zytologischen Ergebnisse von Lymphozyten wurde hier als schlechter beschrieben und erreichte erst bei einer Zählung von 500 Zellen akzeptierbare Werte der Übereinstimmung (ICC >0,85) (De Lorenzi et al. 2009).

Zur Beurteilbarkeit und Einstufung der Ergebnisse der aktuellen Studie werden die Ergebnisse mit einem ICC \geq 0,75 und dem gewichteten Kappa \geq 0,6 als eine gute Reproduzierbarkeit gewertet.

Die Labore und Untersucher, die Prozentangaben machten, erreichten ähnlich gute Ergebnisse der Reproduzierbarkeit für neutrophilen Granulozyten in der BAL und im TBS (ICC >0,895). Für Makrophagen wurden ebenfalls bei diesen Laboren im TBS und in der BAL gute (ICC >0,75) Werte für die Reproduzierbarkeit erreicht. Diese Ergebnisse ähneln den der anderen Studien. Für die Reproduzierbarkeit der Lymphozyten wurden in dieser Studie, wie in einer der oben aufgeführten Studien, eine insgesamt schlechtere Reproduzierbarkeit erreicht. Nur ein Labor konnte eine gute Übereinstimmung (ICC 0,88) der Lymphozytenzählung in der BAL erreichen, ansonsten konnten nur moderate bis schlechte Ergebnisse festgestellt werden (s. Kap. 5.3.). In der aktuellen Studie wurden ebenfalls einige gute Ergebnisse in der Reproduzierbarkeit für Zellarten erreicht, die in geringerer Zahl vorkommen wie Mastzellen und eosinophile Granulozyten.

Insgesamt stimmte somit die Varianz der Ergebnisse innerhalb der Labore, die Prozentangaben machten, mit den guten Ergebnissen zur Reproduzierbarkeit aus anderen Studien überein. Dies wird auf die ähnliche zytologische Auswertung in den Studien zurückgeführt. Allerdings wird hier die intraindividuelle mit der interindividuellen Varianz

verglichen, welche nicht gleich bewertet werden können. Zwar gab es bei einem der Fremdlabore, die Prozentangaben machen, mehr als einen Untersucher, allerdings wurden bei einem anderen Fremdlabor und den Beurteilungen in der Klinik für Pferde alle Ausstriche durch dieselbe Person beurteilt. Man könnte erwarten, dass eine intraindividuelle Reproduzierbarkeit besser ist, da nur die Erfahrung und Interpretation einer Person Einfluss auf die zytologischen Ergebnisse hat und diese nicht durch subjektive Einschätzungen verschiedener Personen verändert wird.

Im Vergleich zu den genannten Studien wurden in zwei Fremdlaboren in der aktuellen Studie subjektive Einschätzungen zu den Ergebnissen der BAL und des TBS gemacht und es konnte eine höhere Varianz der Ergebnisse festgestellt werden. Die Übereinstimmung der semiquantitativen Angaben zu neutrophilen Granulozyten war insgesamt am besten vor allem im TBS (TBS: Kappa $>0,628$). Die Übereinstimmung der Ergebnisse zu den anderen Zellarten der Differentialzellzählung war insgesamt geringer als bei den Laboren, die Prozentangaben machten. Somit wären in der aktuellen Studie wahrscheinlich ähnlich gute Ergebnisse der Übereinstimmung bei allen Laboren wie bei den genannten Studien entstanden, wenn ausschließlich Labore gewählt worden wären, die eine Zellzählung vornehmen. Allerdings wäre dann nicht die Problematik der Vergleichbarkeit von Ergebnissen zwischen verschiedenen Laboren aufgekommen. Es konnte somit gezeigt werden, dass die subjektive Schätzung der Menge einer Zellart, weniger genau ist als eine Zellzählung und zu einer größeren Varianz der Ergebnisse eines Pferdes führt. Trotzdem wurden bei diesen Laboren eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse zur wichtigen Zellart neutrophile Granulozyten erzielt. Da diese Zellart direkten Einfluss auf die Diagnosestellung hat, kann die gute Übereinstimmung aller Labore und Untersucher zu neutrophilen Granulozyten als zufriedenstellendes Ergebnis gewertet werden. Zu den anderen Zellarten der Differentialzellzählung erreichten die Labore mit semiquantitativen Angaben eine mittelmäßige Reproduzierbarkeit der zytologischen Befunde.

Die Varianz der Ergebnisse aller weiterer Parameter, die nicht an der Differentialzellzählung beteiligt waren, war insgesamt bei allen Laboren hoch. Diese Parameter wurden in den aufgeführten Studien im Vergleich zu der aktuellen Studie nicht untersucht. Die genannten Studien beschränkten sich auf die wichtigen Zellarten der Differentialzellzählung (De Lorenzi et al. 2009; Hansen et al. 2019; Warke et al. 2001; Wasko et al. 2011). Zu diesen weiteren Parametern wurden von allen Laboren in der aktuellen Studie subjektive Schätzungen der Menge angegeben, welche durch die Person selbst und die ungleichmäßige Verteilung auf den Objektträgern beeinflusst wurde. Diese weiteren Parameter wie Curschmannspiralen, Fremdmaterial und Mukus geben wichtige Hinweise zur Dauer und Art der Erkrankung, allerdings ist ihr direkter Einfluss auf die Diagnosestellung geringer. Aus diesem Grund ist die größere Varianz dieser Ergebnisse von geringerer Bedeutung.

Bei der BAL wurden insgesamt bessere Ergebnisse in der Reproduzierbarkeit bei mehr Zellarten als im TBS erreicht. Möglicherweise liegt dies an der höheren Viskosität der TBS-Probe, die sich nur schwierig gleichmäßig ausstreichen lässt. Auf diese Weise ist die Zellverteilung im TBS-Ausstrich ungleichmäßiger als in einem BAL Ausstrich, sodass bei der BAL reproduzierbarere Ergebnisse erreicht werden können. Somit wird für ein valideres Ergebnis die Probenentnahme der BAL empfohlen werden. Die genannten Studien beschäftigten sich im Vergleich zur aktuellen Studie nur auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der BAL.

Dennoch muss beachtet werden, dass bei Prozentzahlen und semiquantitativen Begriffen unterschiedliche statistische Maße berechnet wurden. Semiquantitative Begriffe wurden in kategoriale Daten umgewandelt (z.B. 1-5), sodass größere Abstufungen bei unterschiedlichen Befunden entstehen als bei den Prozentzahlen, die als genaue metrische Werte für die Statistik genutzt werden konnten. Auf diese Weise könnten unterschiedliche Ergebnisse bei semiquantitativen Angaben stärkere Auswirkungen auf die Reproduzierbarkeit gehabt haben als unterschiedliche Ergebnisse bei Prozentzahlen. Das gewichtete Kappa berücksichtigt allerdings bei den ordinalskalierten Werten die Schwere der unterschiedlichen Einstufung. Auf diese Weise sind unterschiedliche Ergebnisse wie z.B. 1 und 2 weniger gravierend als 1 und 3. So wurde versucht möglichst repräsentative Ergebnisse zur Varianz der Ergebnisse, trotz der unterschiedlichen Angaben zu den zytologischen Befunden der Labore, zu erhalten.

Eine weitere Vergleichsstudie aus der Humanmedizin beschäftigte sich mit der Zuverlässigkeit von ELISA-Serologietests zum Nachweis von Borreliose (Tammemagi et al. 1995). Der Serologietest weist *Borrelia burgdorferi* und somit die Erkrankung nach (Tammemagi et al. 1995). Tammemagi et al. führten ein Laborvergleich zwischen drei und innerhalb von zwei Laboren durch. Insgesamt wurden 27 Proben verblindet untersucht. Der statistische Vergleich erfolgte mit ordinalen Daten und der Berechnung des gewichteten Kappas als Maß der Übereinstimmung wie in der aktuellen Studie. Bei der Beurteilung der Proben konnten drei Ergebnisse durch die Labore angegeben werden. Schließlich wurde eine gute bis exzellente intra- und interindividuelle Übereinstimmung (Kappa: 0,89 und 0,87) der Ergebnisse erzielt (Tammemagi et al. 1995). Somit wurden bessere Ergebnisse als in der aktuellen Studie erzielt. Insgesamt wurden bei der Studie von Tammemagi et al. mehr Proben (27) untersucht und weniger (2) Labore für den intraindividuellen Vergleich herangezogen. Die besseren Ergebnisse ergeben sich vermutlich unter anderem durch die geringere Anzahl der Kategorisierungen/Ergebnisse (positiv, uneindeutig, negativ) im Vergleich zur aktuellen Studie. Ebenfalls wurde die Zuverlässigkeit einer anderen Methode überprüft (ELISA) als in der aktuellen Studie (Zytologie). Es wurde in der genannten Studie die Wichtigkeit zur Überprüfung der Zuverlässigkeit einer Methode betont (Tammemagi et al. 1995). Ebenso sei

die gute Reproduzierbarkeit der Studie nicht auf alle anderen Labore zu übertragen (Tammemagi et al. 1995).

Ursächlich für die unterschiedliche Reproduzierbarkeit der Differentialzellzählung innerhalb der Labore in der aktuellen Studie können die Art und Weise der Untersuchung des Ausstrichs, die Identifikation von Zellen und die subjektiven Erfahrungen der Untersucher sein. Zwischen und innerhalb der Labore erfolgte die Auswertung der TBS- und der BAL-Ausstriche unterschiedlich.

Die mikroskopische Auswertung der Labore, die in der BAL und z.T. auch beim TBS Prozentzahlen angaben, erfolgte wahrscheinlich relativ einheitlich, da alle Labore eine Zellzählung vornahmen und es zu einer genauen Quantifizierung der Zellarten kam. Auf diese Art und Weise untersuchten auch die Untersucher der genannten Studien die Ausstriche, was auch dort zu einer guten Übereinstimmung der Ergebnisse führte (De Lorenzi et al. 2009; Hansen et al. 2019; Warke et al. 2001; Wasko et al. 2011).

Für die Differentialzellzählung zählten die Labore und Untersucher in der aktuellen Studie eine unterschiedliche Anzahl an Zellen (300 und 400), wobei das vierte Labor keine Informationen zum Vorgehen der zytologischen Analyse gab.

Die in der Literatur angegebenen Referenzwerte der neutrophilen Granulozyten, Mastzellen und eosinophilen Granulozyten basieren auf einer Zählung von 400-500 Zellen und werden in Prozenten angegeben (Cian et al. 2015; Couetil und Thompson 2020a; Hoffman 2008). Auch in der Humanmedizin wird eine Zählung von 500 oder 600 Zellen für die Differentialzellzählung der BAL empfohlen (De Brauwer 2002, Stanzel 2013). Eine akkurate Übereinstimmung der Ergebnisse wird bei Zellarten, die seltener vorkommen, erst bei der Zählung einer hohen Anzahl an Zellen beschrieben, wie z.B. bei Mastzellen (De Brauwer 2002; Hansen et al. 2019). Die Labore und Untersucher erreichten trotz geringerer Anzahl gezählter Zellen durch eine ähnliche mikroskopische Auswertung gute Ergebnisse zur Reproduzierbarkeit der Differentialzellzählung in der BAL. Dennoch kann die unterschiedliche Anzahl der gezählten Zellen Einfluss auf die Übereinstimmung der Ergebnisse nehmen.

Die Labore, die keine genaue Quantifizierung der Zellarten durchführten, erreichten insgesamt eine schlechtere Reproduzierbarkeit der Differentialzellzählung, sodass dies auf die zytologische Auswertung und nicht auf die ungleichmäßige Probenverteilung zurückgeführt werden kann.

Auch der untersuchte Bereich des Objektträgers kann bei der Auswertung Einfluss auf die zytologischen Ergebnisse gehabt haben. Bei den semiquantitativen Auswertungen gab ein Labor an mindestens fünf Gesichtsfelder pro Ausstrich zu beurteilen, ein weiteres Labor gab an kein einheitliches Schema zur mikroskopischen Analyse zu haben, da die Zellverteilung auf dem Objektträger sehr unterschiedlich sein kann. Die Klinik für Pferde gab an den TBS Ausstrich mäanderförmig zu untersuchen. Somit kann die Beurteilung unterschiedlicher

Bereiche des Ausstrichs zu einer gewissen Varianz der Ergebnisse geführt haben kann. Bei der Zytozentrifugation wurde beschrieben, dass Lymphozyten und Makrophagen nicht gleichmäßig in den Quadranten des Objektträgers verteilt sind (De Brauwer 2000b). Außerdem führt wie mehrfach erwähnt die Ausstrichtechnik ebenfalls zu Variationen in der Zellverteilung auf dem Objektträger. Eine Studie empfiehlt daher die 5-Feld-Methode zur Durchführung der Differentialzellzählung für eine bessere Reproduzierbarkeit der Mastzellzählung und einer besseren Beurteilung ungleichmäßig verteilter Proben (Fernandez et al. 2013).

Es wird klar, dass zwischen den Laboren keine einheitliche mikroskopische Auswertung stattfand, was in einer unterschiedlichen Reproduzierbarkeit der Ergebnisse resultierte.

Auch eine inakkurate Identifikation der Zellen durch die Untersucher kann Einfluss auf die zytologischen Ergebnisse gehabt haben. Von einigen Autoren wird die Verwechslungsgefahr von Lymphozyten und kleinen Makrophagen, Epithelzellen und Mastzellen beschrieben (De Brauwer 2000b; Hansen et al. 2019; Hewson and Viel 2002; Hoffman et al. 2003; Mayer et al. 1990).

Eine Studie zur Beteiligung von Epithelzellen an der Differentialzellzählung zeigte, dass eine Notwendigkeit besteht, immer dieselben Zellarten in die Differentialzellzählung aufzunehmen (Allen et al. 2019). Hier wurden bei der Einbeziehung von Epithelzellen in die Differentialzellzählung bei 41% der Pferde >20% neutrophile Granulozyten im TBS festgestellt. Bei der Differenzierung ohne Epithelzellen wurden bei 62% der Pferde >20% neutrophile Granulozyten angegeben (Allen et al. 2019). Die Anteile der Epithelzellen in der BAL waren insgesamt geringer und somit die Auswirkungen auf die Diagnosestellung geringer (Allen et al. 2019). Bei einem Labor konnte durch die Prozentangaben der Differentialzellzählung festgestellt werden, dass hier Epithelzellen in die Differenzierung mit aufgenommen wurden. Dies kann zu Unterschieden in den zytologischen Ergebnissen der einzelnen Zellarten im Vergleich zu anderen Laboren geführt haben und erfordert eine Vereinheitlichung der an der Differentialzellzählung beteiligten Zellarten. Generell wird in der Humanmedizin und beim Pferd empfohlen nur Entzündungszellen bei der Zellzählung zu differenzieren (Richard et al. 2010; Meyer et al. 2012).

Darüber hinaus beurteilten in drei Fremdlaboren mehrere Untersucher die TBS und BAL Ausstriche, wobei man davon ausgehen kann, dass dies trainierte, spezialisierte Untersucher mit Erfahrung im Bereich der TBS und BAL Zytologie sind. Dennoch kann man davon ausgehen, dass die verschiedenen Untersucher innerhalb eines Labors die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse verändern, da im Vergleich zu Laboren, in denen nur ein Untersucher die Beurteilung vornimmt, hier noch die unterschiedliche Erfahrung und Interpretation der Untersucher Einfluss auf die zytologischen Ergebnisse und Diagnosestellungen haben könnten. Trotzdem erzielte ein Labor, das mehrere Untersucher hatte, eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse zur Differentialzellzählung.

Es konnte gezeigt werden, dass eine unterschiedliche mikroskopische Auswertung die Reproduzierbarkeit zytologischer Ergebnisse innerhalb der Labore beeinflusst. Es wurde erwartet, dass die zytologischen Ergebnisse eines Pferdes in einem Labor keine oder nur eine geringe Varianz aufweisen und dies war für die wichtigste Zellart (neutrophile Granulozyten) auch der Fall. Dennoch variierten bei einigen Laboren die Ergebnisse der anderen Zellarten der Differentialzellzählung stärker.

6.3 Diskussion der Beurteilung verschiedener Labore

Die zytologische Beurteilung von TBS und BAL stellt in der Diagnostik von equinem Asthma einen wichtigen Teil der Atemwegsuntersuchung da, wobei die endgültige Diagnosestellung und Therapie von der zytologischen Verdachtsdiagnose beeinflusst wird. Bei einem Umzug oder Tierarztwechsel kann es dazu kommen, dass TBS- und BAL-Proben zu unterschiedlichen Laboren geschickt und somit unterschiedlich ausgewertet werden. Besonders für Verlaufsuntersuchungen sollten die Ergebnisse zwischen verschiedenen Laboren allerdings vergleichbar sein, um eine valide Diagnose stellen zu können. In der aktuellen Studie konnte gezeigt werden, dass die zytologische Befundung zwischen verschiedenen Laboren innerhalb Deutschlands nicht einheitlich erfolgt und damit eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse nicht zwischen allen Laboren gewährleistet ist.

Wie beschrieben konnte festgestellt werden, dass die Labore bei der zytologischen Auswertung unterschiedlich vorgehen und die Ergebnisse der Differentialzellzählung unterschiedlich ausdrücken. Weder im TBS noch in der BAL erfolgte dies einheitlich. Da bei der BAL die Zellzählung und Angabe von Prozentwerten bei der Differentialzellzählung zur unterstützenden Diagnosestellung von MEA empfohlen wird (Couetil et al. 2016), war die semiquantitative Befundung von zwei Laboren überraschend und stellte ein Problem für den Vergleich der Ergebnisse dar. Ebenso gab es Probleme bei der Vergleichbarkeit der Labore, die semiquantitative Begriffe verwendeten. Aus diesen Gründen waren die zytologischen Ergebnisse der Fremdlabore und Untersucher für das gleiche Pferde nicht vergleichbar.

Daher bestand die Notwendigkeit einer Vereinheitlichung der zytologischen Befundergebnisse von TBS und BAL. Im Rahmen der Studie wurde daraufhin ein vereinheitlichtes Beurteilungsschema zum Vergleich zytologischer Ergebnisse unterschiedlicher Labore erstellt. Dies soll ein besseres Verständnis für unterschiedliche zytologische Befundergebnisse und auch eine bessere Interpretationsmöglichkeit der Befunde ermöglichen.

Dennoch stellt die Zellzählung in der BAL und Prozentangaben zur Differentialzellzählung den Goldstandard dar. Trotzdem könnte das Beurteilungsschema zukünftig von Laboren aufgegriffen werden, die semiquantitative Angaben bei der Differentialzellzählung machen, um diese Ergebnisse mit den genauen quantitativen Werten vergleichen zu können.

6.4 Diskussion über die interindividuelle Varianz zytologischer Ergebnisse

Um die interindividuelle Varianz zytologischer Ergebnisse zwischen den verschiedenen Laboren und Untersuchern beurteilen zu können, war es nötig die Ergebnisse der Labore in einheitliche Werte zu überführen. Die Befundergebnisse aller Labore wurden in das vereinheitlichte Beurteilungsschema übertragen. Dadurch wurden die ursprünglichen Ergebnisse der Labore verändert.

Es konnte festgestellt werden, dass eine geringe Übereinstimmung der Ergebnisse zwischen Laboren in Deutschland für fast alle Parameter, die in der zytologischen Untersuchung bewertet wurden, besteht. Die interindividuelle Varianz der zytologischen Ergebnisse zwischen verschiedenen Laboren ist somit groß. Nur die Reproduzierbarkeit der Angaben zu neutrophilen Granulozyten ist in der BAL und im TBS gut (Krippendorff's $\alpha > 0,7$). Auch das 95%-Konfidenzintervall ist klein, sodass man von einer genauen Schätzung des Wertes der Übereinstimmung und einer geringen Varianz der Ergebnisse ausgehen kann. Dies stellt wahrscheinlich die wichtigste Zellart zur Stellung der Verdachtsdiagnose dar und hat somit direkten Einfluss auf das weitere Management und die Therapie des Pferdes. Die Quantität und Qualität dieser Zellart liefert wichtige Hinweise für die Schwere des equinen Asthmas und für die Abgrenzung zu Differentialdiagnosen. Ebenso konnte aufgrund der Reproduzierbarkeit der neutrophilen Granulozyten von einer grundsätzlich ähnlichen Zellverteilung auf den Ausstrichen des gleichen Pferdes ausgegangen werden.

Somit scheinen die Labore bei diesem wichtigen Parameter übereinzustimmen. Dennoch sind weitere Zellarten und Materialien ebenfalls wichtig zur Beurteilung der Krankheitsdauer, -ursache und -pathogenese. Diese Ergebnisse variierten allerdings deutlich zwischen den Laboren. Wenn keine reproduzierbaren Ergebnisse zwischen den Laboren erzielt werden können, ist die Frage, wie valide zytologische Verlaufsuntersuchungen durch unterschiedliche Labore sind. Ebenso stellt sich die Frage, wie groß ein Einfluss der zytologischen Ergebnisse auf die endgültige Diagnosestellung sein darf.

Große Laborstudien zur Zuverlässigkeit einer Methode wurden von der Autorin nur im humanmedizinischen Bereich gefunden. Eine Studie beschäftigte sich mit der Zuverlässigkeit der Knochenmarkszytologie bei metastasierendem Neuroblastom (Schumacher-Kuckelkorn et al. 2021). Dazu untersuchten sechs bis sieben erfahrene Untersucher aus verschiedenen europäischen Laboren zu drei verschiedenen Zeitpunkten 24-28 Proben von Knochenmarksaspiraten. Es wurden unter anderem die Ergebnisse zum Vorkommen und der prozentualen Menge von Tumorzellen zwischen den Untersuchern verglichen. Die Prozentangaben wurden wie in der aktuellen Studie in Kategorien zur Vergleichbarkeit eingeteilt. Ebenso wurde Krippendorff's α zur Quantifizierung der Übereinstimmung der Ergebnisse wie in der aktuellen Studie berechnet. Insgesamt konnte keine zuverlässige Quantifizierung der Tumorzellen im Knochenmarksaspirat erreicht werden (Krippendorff's

alpha 0,325-0,45), weswegen diese Diagnostik in der Studie in Frage gestellt wurde (Schumacher-Kuckelkorn et al. 2021). Somit ist im Vergleich zur aktuellen Studie ebenfalls auf eine nicht ausreichende Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei einer medizinischen Untersuchung hingewiesen worden. Die geringe Übereinstimmung der Ergebnisse wurde wie auch in der aktuellen Studie z.T. durch die ungleichmäßige Probenverteilung auf dem Ausstrich zurückgeführt (Schumacher-Kuckelkorn et al. 2021). In der genannten Studie wurden ähnlich viele Untersucher und Proben für die zytologische Auswertung wie in der aktuellen Studie herangezogen. In der aktuellen Studie wurden vier Fremdlabore und 2 Untersucher und die Proben der 30 fiktiven Pferde für den statistischen Vergleich genutzt. In der Studie von *Schumacher-Kuckelkorn et al.* führte eine Verringerung der Kategorien zur Anzahl der Tumorzellen zu einer geringen Verbesserung der Übereinstimmung. In der aktuellen Studie wurden fünf Kategorien zur Unterscheidung der Menge bei den wichtigsten Zellarten angegeben. Wahrscheinlich hätte eine geringere Anzahl der Kategorien/Gradeinteilungen ebenfalls zu einer besseren Übereinstimmung geführt.

Insgesamt zeigt auch die Studie von *Schumacher-Kuckelkorn et al.*, dass die Notwendigkeit zur Überprüfung der Zuverlässigkeit einer diagnostischen Untersuchung in der Medizin besteht, da eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse nicht immer gegeben ist. Da allerdings meist die Diagnose und Therapie von den Befunden einer Untersuchung abhängen, ist die Wichtigkeit einer zuverlässigen Methode nachzuvollziehen.

Eine Limitierung des interindividuellen Vergleichs stellt die nachträgliche Umwandlung der ursprünglichen Befunde in Werte des standardisierten Befundbogens dar. Dadurch konnten nicht mehr die genauen Prozentangaben einiger Labore genutzt werden. Ebenso konnte es dazu kommen, dass zwei ähnliche Prozentangaben zu einem Parameter des gleichen Pferdes in unterschiedliche Stufen des Befundbogens eingetragen wurden, da die prozentuale Spannbreite nicht beide Prozentangaben umfasste. Darüber hinaus stimmten die Definitionen der semiquantitativen Begriffe eines Labors nicht gut mit denen anderer Labore und denen des Befundbogens überein, sodass bei diesem Labor die semiquantitativen Begriffe den am besten passenden Prozentwerten zugeordnet wurden. Darüber hinaus mussten auch Gruppen zusammengefasst werden (s. Kap. 3.6.). Die meisten Ergebnisse der Labore ließen sich allerdings gut in den Befundbogen integrieren, da dieser auf Grundlage der Informationen der einzelnen Labore erstellt wurde. Daher wird der vereinheitlichte Befundbogen als gute Möglichkeit gesehen, zytologische Ergebnisse zwischen verschiedenen Laboren zu vergleichen. Dennoch kann es durch die nachträgliche Einteilung der Befunde zu einer gewissen Verschlechterung der Reproduzierbarkeit gekommen sein.

Darüber hinaus hätte eine größere Studienpopulation zu einer genaueren Schätzung der Werte zur Übereinstimmung der Ergebnisse geliefert.

6.5 Diskussion über die Befunde und Befundinterpretationen der Labore

Entscheidend für die Diagnose in der Zytologie sind die erhobenen zytologischen Befunde wie die Quantität und Qualität der Entzündungszellen und alle weiteren Substanzen, die Hinweise auf die Art und Dauer der Entzündung geben. Daneben spielt die Interpretation der zytologischen Befunde eine große Rolle. Es sollte die Frage gestellt werden, welche Befunde hinweisend auf equines Asthma sind, wie man die Schwere der Erkrankung unterscheiden sollte und wie man die Abgrenzung zu anderen Verdachtsdiagnosen vornimmt.

In dieser Studie fiel auf, dass die Interpretation der Befunde zwischen den Laboren nicht immer übereinstimmt. Gerade bei einem Laborwechsel sollte allerdings der Praktiker darauf vertrauen, dass die zytologische Befundung und Interpretation in verschiedenen Laboren gleich erfolgt, um keine irreführenden Verdachtsdiagnosen zu erhalten. Für die Diagnosestellung des MEA und SEA wird die BAL-Zytologie herangezogen und die Schwere der neutrophilen Entzündung beurteilt. Bei einem Anteil von 10-25% neutrophile Granulozyten in der Differentialzellzählung besteht nach allgemeinen Empfehlungen der Verdacht auf MEA, bei >25% bereits auf SEA. Durch die Untersucher der Klinik für Pferde erfolgte die Diagnosestellung nach diesen allgemeinen Empfehlungen. Darüber hinaus werden bei MEA weitere Subtypen unterschieden, die auf einer Erhöhung der Mastzellzahl (>5%) und der Zahl eosinophiler Granulozyten basieren (Couetil et al. 2016; Hoffman A. et al. 2003). Bei der TBS Zytologie gibt es dagegen keine allgemein anerkannten Grenzwerte bei den neutrophilen Granulozyten, die eine Differenzierung der Krankheitsschwere ermöglichen. Eine Übereinstimmung der BAL und TBS Zytologie ist ebenfalls nicht immer gegeben, sodass es zu Unstimmigkeiten in der Diagnosestellung kommen kann. Studien belegen, dass es basierend auf den Prozentwerten der neutrophilen Granulozyten in 37% der Diagnosen von jungen Rennpferden mit Leistungsinsuffizienz und in 17,5% bei 154 beprobten Pferden zu unterschiedlichen Diagnosestellungen zwischen TBS und BAL kam (Malikides et al. 2003; Rossi et al. 2018). In diesen Studien wurde zwischen gesunden und erkrankten Pferden mit Atemwegsentzündung unterschieden, wobei >20% neutrophile Granulozyten im TBS und >5% in der BAL eine Atemwegsentzündung bestätigten.

Auch in dieser Studie konnten bei einzelnen Pferden keine übereinstimmenden Diagnosen zwischen TBS und BAL gestellt werden. Bei diesen Befunden wurde angegeben, dass die BAL das Mittel der Wahl zur Diagnose von equinem Asthma darstellt und daher zu bevorzugen ist.

Die Verdachtsdiagnose equines Asthma wurde bei den meisten Laboren mit neutrophilen bzw. purulenten und pyogranulomatösen (neutrophile Granulozyten und Makrophagen) Entzündungen, manchmal in Zusammenhang mit einer lymphozellulären Infiltration, gestellt (s. Kap. 5.5.2.). Darüber hinaus waren für die Labore das Vorkommen einer erhöhten Zellzahl,

Auch in dieser Studie konnten bei einzelnen Pferden keine übereinstimmenden Diagnosen zwischen TBS und BAL gestellt werden. Bei diesen Befunden wurde angegeben, dass die BAL das Mittel der Wahl zur Diagnose von equinem Asthma darstellt und daher zu bevorzugen ist.

Die Verdachtsdiagnose equines Asthma wurde bei den meisten Laboren mit neutrophilen bzw. purulenten und pyogranulomatösen (neutrophile Granulozyten und Makrophagen) Entzündungen, manchmal in Zusammenhang mit einer lymphozellulären Infiltration, gestellt (s. Kap. 5.5.2.). Darüber hinaus waren für die Labore das Vorkommen einer erhöhten Zellzahl, vermehrte Mengen an Mukus, Curschmannspiralen, mehrkernige Zellen oder Riesenzellen, Becherzellen, schaumige Makrophagen, Makrophagen in Phagozytose und zum Teil extra- und intrazelluläres Fremdmaterial und extrazelluläre Bakterien hinweisend auf eine gestörte Clearance, Obstruktionsprozesse und eine Hyper- und Dyskrie. Diese Befunde wurden in Kapitel 2.7.4. ausführlich beschrieben und sind Anzeichen einer chronischen Entzündung der Atemwege. Alle Labore brachten diese Befunde mit equinem Asthma in Verbindung.

Einige der lungengesunden Pferde wurden durch die Fremdlabore falsch mit MEA diagnostiziert. So konnte keine einheitliche Abgrenzung zu einem physiologischen Zellbild zwischen den Fremdlaboren erreicht werden. Allein die Untersucher der Klinik für Pferde ordneten die Befunde der lungengesunden Pferde richtig ein.

Fast alle Labore in dieser Studie orientierten sich bei der Schwere der Erkrankung an der Anzahl der neutrophilen Granulozyten. Bei den Laboren, die eine semiquantitative Differentialzellzählung vornahmen, wurde nicht ganz klar, ab wann MEA und SEA diagnostiziert wurde. MEA wurde von Labor 1 bei zwei Pferden bei „einigen“ neutrophilen Granulozyten in der BAL vermutet. Die Definition des Begriffs „einige“ bedeutet bei Labor 1 ein Anteil von 20-40% neutrophiler Granulozyten am Gesamtzellbild und steht somit im Widerspruch zu den festgelegten Referenzwerten für MEA (10-25%). Labor 2 diagnostizierte häufig SEA, was bei drei Pferden (8b, 14b, 12a) im Zusammenhang mit einem „mittelgradigen“ Anteil an neutrophilen Granulozyten stand. Labor 2 definierte „mittelgradig“ bei diesem Zelltyp als 10-25% der Zellpopulation am Gesamtzellbild. Auch dies würde nicht mit den allgemeinen Grenzwerten für SEA (>25%) übereinstimmen. Labor 2 gab darüber hinaus einen Anteil von „hochgradig“ (Definition Labor 2 >25%) und „dominierend“ (Definition Labor >90%) neutrophilen Granulozyten bei der Verdachtsdiagnose SEA an, was hinsichtlich der Diagnosestellung zutreffender erscheint. Bei diesen Laboren trägt somit die Schwere der neutrophilen Entzündung zur Diagnosestellung bei, allerdings konnte nicht nachvollzogen werden, ab wann die Einteilung der Verdachtsdiagnosen in unterschiedliche Schweregrade der Erkrankung erfolgt (MEA und SEA).

Labor 4 diagnostizierte bei einigen Pferden eine mittelgradige akute/subakute eitrige Bronchitis durch eine Infektion mit bakteriellen Erregern (s. Kap. 5.5.2 und 5.5.3). Bei allen Pferden mit dieser Diagnose wurde auch die Differentialdiagnose equines Asthma (SEA oder MEA) durch aus der Atemluft aufgenommene Fremd- oder Reizstoffe gestellt. Dieses Labor hat die Erfahrung gemacht, dass häufig SEA als Grunderkrankung vorliegt und eine sekundäre bakterielle Infektion die chronischen zytologischen Befunde überdeckt. Besonders wenn die Symptome schon länger bestehen oder rezidivierend sind, liegt der Verdacht auf eine chronische Bronchitis mit Überempfindlichkeit nahe. Dennoch wurden bei einigen Pferden keine Anzeichen auf ein chronisches Krankheitsgeschehen gefunden und allein eine Infektion mit bakteriellen Erregern als Krankheitsursache vermutet. Daraufhin wurde von Labor 4 eine passende antibiotische Therapie empfohlen. Die Vermutung einer bakteriellen Bronchitis wurde bei diesem Labor gestellt, sobald eine überwiegend neutrophile Entzündung vorlag und nur wenig oder kaum aktivierte Makrophagen, Immunzellen und unreife Epithelien vorkamen. Andere Labore gaben bei diesen Befunden eine hochgradige purulente Entzündung ohne Hinweise auf eine bakterielle Infektion an und stellten SEA als Verdachtsdiagnose.

Es wurde beschrieben, dass die Anzahl der neutrophilen Granulozyten bei akuten Entzündung über 40% steigen kann und es bei einem septischen Prozess zu einer massiven Infiltration mit Neutrophilen kommt. Neutrophile sind wichtige Zellen bei einer bakteriellen Infektion, kommen allerdings auch bei nicht-infektiösen Erkrankungen vor (Bain, 1997; Robinson, 2001a). Wichtig ist es dann anhand des morphologischen Zustandes der Zellen zwischen den beiden Zuständen zu unterscheiden (Bain, 1997; Robinson, 2001a). Bei einer bakteriellen Bronchitis zeigen die Neutrophilen Anzeichen einer Degeneration in Form von Karyolyse, Kernpyknose und Karyorrhesis (s. Kapitel 2.7.4.). Bei equinem Asthma sind die Neutrophilen intakt und zum Teil hypersegmentiert, wie auch durch einige der Labore in dieser Studie beschrieben (s. Kapitel 2.7.4.). Labor 4 gab nur bei einem Befund (Pferd 15a) an, dass die neutrophilen Granulozyten lytisch waren, ansonsten ist nicht weiter auf den morphologischen Zustand der Zellen eingegangen worden. Die Pferde, die durch Labor 4 die Verdachtsdiagnose einer bakteriellen Bronchitis erhielten, hatten einen hohen Anteil an Neutrophilen an der Differentialzellzählung (58-91%, nicht klar ob TBS oder BAL). Mit der Erkrankungsdauer nimmt bei chronischen Erkrankungen die Zahl der Makrophagen und auch multinukleären Zellen zu, ebenso wie eine Meta- und Dysplasie von Epithelzellen (Bain 1997). Die klinischen Symptome des Pferdes spielen eine wichtige Rolle bei der Differenzierung zwischen einer septischen und nicht-septischen Bronchitis. Systemische Anzeichen einer Infektion und hämatologische Veränderungen führen zum Ausschluss der Diagnose equines Asthma (Couetil et al. 2016).

Im Rahmen dieser Studie konnte somit gezeigt werden, dass es zu unterschiedlichen zytologischen Verdachtsdiagnosen zwischen und zum Teil innerhalb verschiedener Labore bei dem gleichen Pferd kommen kann. Die unterschiedlichen Diagnosen beziehen sich nicht nur auf unterschiedliche Schweregrade des equinen Asthmas, sondern auch auf andere Diagnosen, welche eine andere Therapie des Pferdes zur Folge haben. Eine schwere neutrophile Entzündung der Atemwege wird somit nicht einheitlich zwischen verschiedenen Laboren interpretiert. Ebenso konnte keine einheitliche Reproduzierbarkeit der Differenzierung zwischen MEA und SEA zwischen und innerhalb der Labore festgestellt werden. Bei vielen Befunden stellten die Labore nur die Verdachtsdiagnose equines Asthma, ohne sich auf den Schweregrad festzulegen. Die unterschiedlichen Verdachtsdiagnosen bei den gesunden Pferden zeigen, dass allein vom zytologischen Bild her eine Differenzierung zwischen gesunden und mild bis moderat erkrankten Pferden schwierig ist, sobald geringe Anzeichen einer chronischen Entzündung vorliegen. Aus diesen Gründen stellt sich die Frage, wie valide eine zytologische Untersuchung in Bezug auf die Unterscheidung zwischen MEA und SEA ist und ob eine korrekte Interpretation überhaupt ohne die klinischen Befunde möglich ist. Allein die Untersucher der Klinik für Pferde ordnete die Befunde der gesunden Pferde richtig ein. Ihre Diagnosestellungen variierten bei den erkrankten Pferden z.T. ebenfalls zwischen den Proben a und b abhängig vom Schweregrad der neutrophilen Entzündung.

6.6 Diskussion über den Zusammenhang klinischer Symptome und zytologischer Befunde

In der Klinik für Pferde wurde im Rahmen der Atemwegsuntersuchung eine klinische, endoskopische und zytologische Untersuchung durchgeführt. Ebenso gab es zu jedem Pferd einen Vorbericht, der Informationen zum Verlauf der Erkrankung enthielt. Das Zusammenspiel aller Informationen und Befunde wird als Goldstandard zur Diagnosestellung von equinem Asthma angesehen (Couetil et al. 2016).

Die als gesund eingestufteten Pferde wiesen vorberichtlich keine respiratorischen Symptome auf und zeigten auch bei der klinischen Untersuchung keine besonderen Befunde. Durch diese Informationen war es in der Klinik möglich, die zytologischen Befunde der Pferde besser einordnen zu können. Daher wurden die geringgradige Dys- und Hyperkrinie oder die erhöhte Phagozytose einer erhöhten Umweltbelastung zugeordnet, anstatt MEA oder eine chronische Erkrankung in Remission zu vermuten.

Die Pferde mit MEA wiesen zytologisch z.T. knapp über 25% neutrophile Granulozyten auf, zeigten allerdings nur wenig klinische Symptome. Besonders ein Pferd wies nur vorberichtlich chronischen Husten auf und zeigte kaum klinische Symptome. Nur endoskopisch konnte eine erhöhte Menge viskösen Sekrets und zytologisch eine hochgradige Neutrophilie festgestellt werden. Allein durch das Zusammenspiel aller Informationen war es möglich bei diesem Pferd

die Diagnose MEA zu stellen. Fast alle Labore vermuteten SEA aufgrund der eindeutigen zytologischen Befunde. Somit ergab sich bei diesem Pferd eine deutliche Divergenz zwischen den klinischen und zytologischen Befunden. Auch bei den anderen Pferden mit MEA war eine korrekte zytologische Diagnosestellung ohne weitere Informationen durch die erhöhte Anzahl der Neutrophilen schwierig.

Die Labore erhielten zu den Proben des gleichen Pferdes unterschiedliche Vorberichte, die nicht den ursprünglichen Befunden des Pferdes entsprachen. Somit wurde die zytologische Diagnosestellung erschwert. Bei einigen Befunden wurde nur equines Asthma vermutet und zur endgültigen Diagnosestellung darauf hingewiesen, die Befunde der zytologischen Untersuchung in Zusammenhang mit den klinischen und auch weiteren Untersuchungen zu sehen. Somit war es den Laboren bei einigen Befunden nicht möglich ohne weitere Informationen eine genaue Verdachtsdiagnose zu stellen.

Es kann geschlussfolgert werden, dass eine alleinige Interpretation der zytologischen Befunde zwischen und innerhalb der Labore nur zu mäßig reproduzierbaren Verdachtsdiagnosen führt. Ohne einen ausführlichen Vorbericht mit klinischen und endoskopischen Symptomen kann nur schwierig eine valide Verdachtsdiagnose gestellt werden.

Aufgrund dieser Erkenntnisse wird deutlich, dass die zytologische Untersuchung nur einen kleinen Teil zur Diagnosestellung beitragen sollte und die klinischen Symptome und der Krankheitsverlauf ausschlaggebend für die Diagnosestellung sind. Die Diagnose und Therapie sollten sich daher nicht allein auf die zytologischen Befunde von TBS und BAL stützen.

6.7 Schlussfolgerung und Ausblick

Zunächst konnte beim Vergleich der intra- und interindividuellen Varianz zytologischer Ergebnisse des gleichen Pferdes festgestellt werden, dass zwischen verschiedenen Laboren keine einheitliche zytologische Befundung von TBS und BAL erfolgte.

Die Annahme, dass zwischen und innerhalb der Labore nur eine geringe oder gar keine Varianz der zytologischen Ergebnisse und Verdachtsdiagnosen besteht, kann nicht vollständig bestätigt werden. Die vermutete gute intraindividuelle Reproduzierbarkeit der zytologischen Ergebnisse konnte bei fast allen Laboren zur wichtigen Zellart neutrophile Granulozyten bestätigt werden (ICC >0,75, gewichtetes Kappa >0,6). Dies ist ein wichtiges und gutes Ergebnis, da diese Zellart den größten Einfluss auf die zytologische Diagnosestellung hat. Dennoch wurde bei den Laboren, die eine subjektive Schätzung zur Menge einer Zellart machten (semiquantitative Angaben), bei einigen anderen Zellarten wie Makrophagen oder eosinophile Granulozyten, die ebenfalls wichtig für die Diagnosestellung sind, keine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erreicht (gewichtetes Kappa <0,6). Bei der Untersuchung der BAL kam es insgesamt zu einer größeren Reproduzierbarkeit der zytologischen

Ergebnisse als beim TBS. Aus diesem Grund wird die BAL für validere zytologische Ergebnisse empfohlen.

Der Vergleich der interindividuellen Varianz konnte nur durch das erstellte vereinheitlichte Scoring System erfolgen und ergab eine deutliche Varianz der zytologischen Ergebnisse. Allein für neutrophile Granulozyten konnte eine akzeptable Reproduzierbarkeit in der BAL und im TBS zwischen allen Laboren und Untersuchern erreicht werden (Krippendorff's $\alpha > 0,7$). Da die Neutrophilen einen großen Einfluss auf die Diagnosestellung haben, ist auch dies als ein gutes Ergebnis zu werten. Die anderen bewerteten Parameter haben meist einen geringeren Einfluss auf die Diagnose, daher ist die größere Varianz der Ergebnisse von geringerer Bedeutung. Dennoch wird die zytologische Diagnose durch die Beurteilung aller Parameter gestellt und nicht allein von den neutrophilen Granulozyten abhängig gemacht. Insgesamt ist die Übereinstimmung der zytologischen Ergebnisse innerhalb der Labore/Untersucher besser als zwischen verschiedenen Laboren oder Untersuchern.

Auch die Reproduzierbarkeit zytologischer Verdachtsdiagnosen war gemischt und es kam z.T. zu unterschiedlichen Verdachtsdiagnosen für das gleiche Pferd durch unterschiedliche Labore und zum Teil auch innerhalb der Labore. Meistens wurde die Diagnose equines Asthma gestellt, allerdings gab es häufig Unterschiede im Schweregrad der Erkrankung. Ein Labor diagnostiziert bei einigen Pferde darüber hinaus eine bakterielle Infektion. Diese Ergebnisse unterstützten nicht die Vermutung, dass nur eine geringe oder keine Varianz bei den Verdachtsdiagnosen besteht.

Somit kann die Validität von zytologischen Verlaufsuntersuchungen bei einem Laborwechsel in Frage gestellt werden, wenn bereits die einmalige Probenentnahme keine einheitlichen zytologischen Ergebnisse zwischen und zum Teil innerhalb der Labore liefert.

Die zweite Hypothese, dass die TBS- und BAL-Zytologie als zuverlässige Kriterien zur Atemwegsdiagnostik herangezogen werden können und einen wichtigen Teil der Diagnosestellung ausmachen, muss durch diese Arbeit eingeschränkt werden. Es konnten im Rahmen der Studie einige intra- und interindividuelle Unterschiede der zytologischen Ergebnisse sowie Unterschiede bei den Verdachtsdiagnosen zwischen und innerhalb der Labore festgestellt werden, die unter anderem durch die unterschiedliche Auswertung der Proben bedingt sind. Die Zuverlässigkeit der zytologischen Untersuchung von TBS und BAL muss daher kritisch betrachtet werden. Dennoch sollte die Reproduzierbarkeit der zytologischen Ergebnisse mit einer größeren Studienpopulation erneut überprüft werden, um genauere Ergebnisse der Übereinstimmung zu erzielen.

Demnach kann geschlussfolgert werden, dass die zytologische Untersuchung nur zu einem kleinen Teil zur endgültigen Diagnosestellung herangezogen werden sollte und die klinischen Symptome den größten Einfluss auf die Diagnose und damit die weitere Therapie haben sollten. Das Zusammenspiel aller Befunde sollte als Goldstandard für die Diagnosestellung

gelten. Darüber hinaus sollten auch bei Verlaufsuntersuchungen die Verbesserung der klinischen Symptome des Pferdes ausschlaggebend für einen Erfolg der Therapie sein und die zytologischen Ergebnisse nur unterstützend beurteilt werden. Ebenso sollte immer darauf geachtet werden, dass die zytologischen Befunde zu den klinischen Symptomen passen.

Das Fazit dieser Studie ist daher, dass die Entnahme und Bearbeitung von TBS und BAL immer nach einem einheitlichen Protokoll erfolgen sollte, um keine Variationen in den zytologischen Ergebnissen zu verursachen. Darüber hinaus sollte für valide zytologische Ergebnisse besonders bei Verlaufsuntersuchungen immer das gleiche Labor für die zytologische Auswertung herangezogen werden. Allerdings konnte nicht bei allen Laboren eine akzeptierbare intraindividuelle Reproduzierbarkeit zu allen Zellarten der Differentialzellzählung erreicht werden, sodass man, auch wenn das gleiche Labor genutzt wird, die labordiagnostische Analyse kritisch und immer in Zusammenhang mit den klinischen Symptomen sehen muss.

Darüber hinaus besteht die Notwendigkeit einer einheitlichen zytologischen Beurteilung von TBS und BAL, um Ergebnisse zwischen verschiedenen Laboren vergleichen zu können. Als Vorschlag für eine vereinheitlichte Befundung soll das in dieser Studie erstellte Scoring System dienen. Besonders Labore, die eine semiquantitative Differentialzellzählung vornehmen, sollten zu einer einheitlichen Befundung und Definition der Begrifflichkeiten kommen.

Als Ausblick könnte mit Hilfe des neuen Scoring Systems und einer größeren Studienpopulation erneut die interindividuelle Varianz zytologischer Ergebnisse von TBS und BAL überprüft werden, um eine genauere Schätzung der Reproduzierbarkeit zu gewährleisten.

7 Zusammenfassung

Überprüfung der Zuverlässigkeit der zytologischen Untersuchung von Tracheobronchialsekret und Bronchoalveolärer Lavage als Mittel zur Diagnosestellung von equinem Asthma

Equines Asthma ist eine häufig vorkommende chronische Erkrankung der Atemwege und kann Pferde jeden Alters betreffen. Neben einer speziellen klinischen Untersuchung des Atemtrakts spielt die zytologische Untersuchung von Tracheobronchialsekret (TBS) und Bronchoalveolärer Lavage (BAL) eine wichtige Rolle bei der Diagnosestellung von equinem Asthma. Ziel dieser Arbeit war der Vergleich zytologischer Ergebnisse und Verdachtsdiagnosen zwischen und innerhalb verschiedener Labore, um die Zuverlässigkeit der zytologischen Untersuchung von TBS und BAL als diagnostisches Mittel zur Diagnosestellung von equinem Asthma zu überprüfen. Die Hypothesen dieser Arbeit waren die Annahmen, dass bei einem intra- und interindividuellen Vergleich zytologischer Ergebnisse von TBS und BAL innerhalb und zwischen mehreren Laboren nur eine geringe oder gar keine Varianz der Ergebnisse und Verdachtsdiagnosen besteht und die Zytologie als zuverlässiges Kriterium zur Atemwegsdiagnostik herangezogen werden kann.

Als Studienpopulation standen 15 Pferde zur Verfügung, die zur Abklärung respiratorischer Symptome vorgestellt wurden. Zunächst wurden an allen Pferden Atemwegsuntersuchungen durchgeführt und schließlich die Befunde der klinischen, endoskopischen und zytologischen Untersuchung zur endgültigen Diagnosestellung in der Klinik herangezogen. Auf diese Weise erfolgte die Einteilung der Studienpferde in fünf gesunde, fünf Pferde mit mildem bis moderatem und fünf Pferde mit schwerem equinem Asthma. Im Anschluss erfolgte der Versand von luftgetrockneten Ausstrichen von TBS und BAL der Studienpferde an vier Fremdlabore. Zusätzlich wurden die Ausstriche durch zwei klinikinterne Untersucher beurteilt. Durch einen doppelt verblinden Versand der Proben untersuchte jedes Labor und jeder Untersucher zwei Mal die Proben des gleichen Pferdes. Bei den Ergebnissen der Fremdlabore fiel auf, dass die Angaben zur Differentialzellzählung der zytologischen Auswertung im TBS und in der BAL z.T. erhebliche Unterschiede aufwiesen. Zum einen wurden semiquantitative Angaben, zum anderen Prozentzahlen bei der Differenzialzellzählung angegeben. Um die interindividuelle Varianz der Ergebnisse verschiedener Labore zu ermöglichen, wurde ein vereinheitlichtes Scoring System zur zytologischen Befundung von TBS und BAL erarbeitet. Beim Vergleich der intraindividuellen Übereinstimmung der Ergebnisse innerhalb der Fremdlabore und der Untersucher der Klinik für Pferde konnte bestätigt werden, dass eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse der neutrophilen Granulozyten bei fast allen Laboren

in der BAL und im TBS erreicht wurde (ICC > 0,75, gewichtetes Kappa >0,6). Darüber hinaus erreichten die Labore, die Prozentangaben zur Differentialzellzählung machten bei Makrophagen, Lymphozyten, eosinophilen Granulozyten und Mastzellen ebenfalls einige gute Ergebnisse der Übereinstimmung. Die semiquantitativen Angaben resultieren in einer geringeren Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu den Zellarten der Differentialzellzählung innerhalb anderer Labore. Somit hatte die Art und Weise der zytologischen Auswertung Einfluss auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Für die BAL variierten die Ergebnisse insgesamt weniger, sodass diese Probenart für validere zytologische Ergebnisse empfohlen wird. Beim interindividuellen Vergleich der Ergebnisse zwischen allen Laboren konnte ebenfalls eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei den neutrophilen Granulozyten in der BAL und im TBS erreicht werden (Krippendorff's alpha >0,7). Diese Zellart hat den größten Einfluss auf die zytologische Diagnosestellung. Die Ergebnisse zu allen weiteren Zellarten der Differentialzellzählung variierten deutlicher zwischen den Laboren. Bei den lungengesunden Pferden wurde durch die Fremdlabore häufig mildes-moderates equines Asthma diagnostiziert. Bei den erkrankten Pferden wurde meistens equines Asthma diagnostiziert, allerdings variierte der Schweregrad der Erkrankung zwischen und innerhalb der Labore. Ein Labor stellte darüber hinaus bei einigen Pferden die Diagnose einer bakteriellen Bronchitis. Die Hypothese, dass die TBS- und BAL-Zytologie als zuverlässiges Kriterium zur Atemwegsdiagnostik herangezogen werden kann und einen wichtigen Teil der Diagnosestellung ausmacht, muss aufgrund von einigen intra- und interindividuellen Unterschieden der zytologischen Ergebnisse und bei den Verdachtsdiagnosen zwischen und innerhalb der Labore eingeschränkt werden. Die Unterschiede können z.T. auf die variable Auswertung der Proben zurückgeführt werden.

Demnach kann geschlussfolgert werden, dass die zytologische Untersuchung nur zu einem kleinen Teil zur endgültigen Diagnosestellung herangezogen werden sollte und die klinischen Symptome den größten Einfluss auf die Diagnose und damit die weitere Therapie haben sollten. Ohne genaue Angaben der klinischen Symptome und des Vorberichts sind valide zytologische Diagnosen nur eingeschränkt möglich. Das Zusammenspiel aller Befunde sollte als Goldstandard für die Diagnosestellung gelten. Als Empfehlung sollte für valide zytologische Ergebnisse besonders bei Verlaufsuntersuchungen immer das gleiche Labor für die zytologische Auswertung herangezogen werden. Darüber hinaus besteht die Notwendigkeit einer einheitlichen zytologischen Beurteilung von TBS und BAL, um Ergebnisse zwischen verschiedenen Laboren vergleichen zu können. Als Vorschlag für eine vereinheitlichte Befundung soll das in dieser Studie erstellte Scoring System dienen, das in weiteren Studien seine Validität zeigen könnte.

8 Summary

Evaluation of the reliability of the cytological examination of tracheobronchial secretions and bronchoalveolar lavage for the diagnostics of equine asthma

Equine asthma is a common chronic respiratory disease that can affect horses of all ages. In addition to a clinical examination of the respiratory tract, the cytological examination of tracheobronchial secretions (TBS) and bronchoalveolar lavage (BAL) plays an important role in the diagnosis of equine asthma.

The aim of this study was to compare cytological results and tentative diagnoses within and between different laboratories to assess the reliability of cytological examination of TBS and BAL as a diagnostic tool for equine asthma. The hypotheses of this study were that, in an intra- and inter-individual comparison of cytological results from TBS and BAL within and between multiple laboratories, there would be little to no variance in the results and tentative diagnoses, and that cytology could be used as a reliable criterion for respiratory tract diagnostics.

The study population consisted of 15 horses presented for evaluation of respiratory symptoms. Initially, respiratory tract examinations were performed on all horses, and the findings from the clinical, endoscopic, and cytological examinations were used for the final diagnosis in the clinic. This allowed the categorization of the study horses into five healthy horses, five horses with mild to moderate equine asthma, and five horses with severe equine asthma. Air-dried smears of TBS and BAL from the study horses were then sent to four external laboratories. In addition, the smears were evaluated by two examiners from the equine clinic. Each laboratory and examiner analyzed the samples of the same horse twice in a double-blind manner.

The results from the external laboratories showed marked differences in the reported differential cell counts and cytological evaluation of TBS and BAL. Some laboratories provided semi-quantitative data, while others provided percentage values for differential cell counts. To allow for inter-individual variance in the results from different laboratories, a standardized scoring system for cytological assessment of TBS and BAL was developed.

When comparing the intra-individual agreement of results within the external laboratories and examiners from the clinic, it was confirmed that there was good agreement in the results for neutrophil granulocytes in BAL and TBS among most laboratories (ICC > 0.75, weighted kappa > 0.6). Moreover, laboratories that provided percentage values for differential cell counts also showed good agreement for macrophages, lymphocytes, eosinophilic granulocytes, and mast cells. The semi-quantitative data yielded less reproducibility of results for the cell types of differential cell counts among different laboratories. Thus, the method of cytological evaluation influenced the reproducibility of the results. Overall, the results varied less for BAL, indicating

that this sample type is recommended for more valid cytological results. When comparing results between all laboratories, good reproducibility was also achieved for neutrophil granulocytes in BAL and TBS (Krippendorff's alpha > 0.7). This cell type had the greatest impact on cytological diagnosis. The results for all other cell types of differential cell counts varied more between the laboratories. Lung-healthy horses were frequently diagnosed with mild to moderate equine asthma by the external laboratories. In diseased horses, equine asthma was mostly diagnosed, although the severity of the disease varied between and within the laboratories. One laboratory additionally diagnosed bacterial bronchitis in some horses. The hypothesis that TBS and BAL cytology can be used as a reliable criterion for respiratory tract diagnostics and that it plays an important role in the diagnosis needs to be restricted due to some intra- and inter-individual differences in cytological results and variations in tentative diagnoses between and within the laboratories. These differences can be attributed, in part, to the different evaluation methods used for the samples.

Therefore, it can be concluded that cytological examination should only be used as a small part of the final diagnosis, and clinical symptoms should have the greatest influence on the diagnosis and subsequent therapy. Without detailed information on clinical symptoms and medical history, valid cytological diagnoses are limited. The combination of all findings should serve as the gold standard for diagnosis. As a recommendation, the same laboratory should always be used for cytological evaluation, especially in follow-up examinations, to obtain valid cytological results. Additionally, there is a need for a standardized cytological assessment of TBS and BAL to enable comparison of results between different laboratories. The scoring system developed in this study can serve as a suggestion for standardized evaluation and could demonstrate its validity in further studies.

9 Literaturverzeichnis

- Ainsworth D M, Grunig G, Matychak M B, Young J, Wagner B, Erb H N, Antczak D F (2003): Recurrent airway obstruction (RAO) in horses is characterized by IFN-gamma and IL-8 production in bronchoalveolar lavage cells. *Vet Immunol Immunopathol*, 96, 83-91.
- Allen K J, Tennant K V, Franklin S H (2019): Effect of inclusion or exclusion of epithelial cells in equine respiratory cytology analysis. *Vet J*, 254, doi: 10.1016/j.tvjl.2019.105405
- Allen K J, Tremaine W H, Franklin S H (2006): Prevalence of inflammatory airway disease in National Hunt horses referred for investigation of poor athletic performance. *Equine Vet J Suppl*, 38, 529-534.
- Allison R W, Velguth K E (2010): Appearance of granulated cells in blood films stained by automated aqueous versus methanolic Romanowsky methods. *Vet Clin Pathol*, 39, 99-104.
- Azevedo N M S, Azevedo M, Lima P F, Filho H C M (2014): Analysis of Tracheal Secretion in Healthy Horses Undergoing a Vaquejada Simulation Test. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 4, 232-238.
- Baggiolini M, Clark-Lewis I (1992): Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett*, 307, 97-101.
- Bain F T (1997): Cytology of the respiratory tract. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 13, 477-486.
- Barton A K, Gehlen H (2022): Equine Asthma – Update on terminology, diagnosis and therapy. *Pferdeheilkunde Equine Medicine*, 38, 320–335.
- Barton A K, Venner M, Seemann-Jensen A, Ohnesorge B (2007): Tracheobronchialsekret (TBS)-Analyse und Bronchoalveoläre Lavage (BAL) beim Pferd. *Pferdespiegel*, 10, 60-65.
- Basano I, Romolo A, Iamone G, Memoli G, Riccio B, Lavoie J P, Miniscalco B, Bullone M (2022): Giant Multinucleated Cells Are Associated with Mastocytic Inflammatory Signature Equine Asthma. *Animals (Basel)*, 12, 1070, doi: 10.3390/ani12091070
- Baughman R P (2007): Technical aspects of bronchoalveolar lavage: recommendations for a standard procedure. *Semin Respir Crit Care Med*, 28, 475-485.
- Bedenice D, Mazan M R, Hoffman A M (2008): Association between Cough and Cytology of Bronchoalveolar Lavage Fluid and Pulmonary Function in Horses Diagnosed with Inflammatory Airway Disease. *J Vet Intern Med*, 22, 1022-1028.
- Beekman L, Tohver T, Leguillette R (2012): Comparison of Cytokine mRNA Expression in the Bronchoalveolar Lavage Fluid of Horses with Inflammatory Airway Disease and Bronchoalveolar Lavage Mastocytosis or Neutrophilia Using REST Software Analysis. *J Vet Intern Med*, 26, 153-161.
- Belgaumi U, Shetty P (2013): Leishman Giemsa cocktail as a new, potentially useful cytological technique comparable to Papanicolaou staining for oral cancer diagnosis. *J Cytol*, 30, 18-22.

- Bertram C A, Dietert K, Pieper L, Erickson N A, Barton A K, Klopffleisch R (2018): Effects of on-slide fixation on the cell quality of cytocentrifuged equine bronchioalveolar lavage fluid. *Vet Clin Pathol*, 47, 513-519.
- Bessonnat A, Helie P, Grimes C, Lavoie J P (2022): Airway remodeling in horses with mild and moderate asthma. *J Vet Intern Med*, 36, 285-291.
- Binder T, Diem H, Fuchs R, Gutensohn K, Nebe T (2012): Pappenheim-Färbung: Beschreibung einer hämatologischen Standardfärbung – Geschichte, Chemie, Durchführung, Artefakte und Problemlösungen. *Laboratoriumsmedizin*, 36, 293-309.
- Block W, Lämmer M, Venner M (2011): Die bronchoalveoläre Lavage beim Fohlen: Indikationen, Methode und Ergebnisse. *Pferdeheilkunde*, 27, 495-503.
- Bond S, Leguillette R, Richard E A, Couetil L, Lavoie J P, Martin J G, Pirie R S (2018): Equine asthma: Integrative biologic relevance of a recently proposed nomenclature. *J Vet Intern Med*, 32, 2088-2098.
- Bosse Y, Rousseau E, Amrani Y, Grunstein M M (2013): Smooth muscle hypercontractility in airway hyperresponsiveness: innate, acquired, or nonexistent?. *J Allergy (Cairo)*, 2013, doi: 10.1155/2013/938046
- Brooks P J, Glogauer M, McCulloch C A (2019): An Overview of the Derivation and Function of Multinucleated Giant Cells and Their Role in Pathologic Processes. *Am J Pathol*, 189, 1145-1158.
- Bucchieri F, Puddicombe S M, Lordan J L, Richter A, Buchanan D, Wilson S J, Ward J, Zummo G, Howarth P H, Djukanovic R, Holgate S T, Davies D E (2002): Asthmatic Bronchial Epithelium Is More Susceptible to Oxidant-Induced Apoptosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 27, 179–185.
- Bullone M (2016): Reversibility of Airway Remodeling in equine Asthma - Contribution of anti-inflammatory and bronchodilator therapies. Doktorarbeit (Ph.D.), Université de Montréal, S. 5-45
- Bullone M, Joubert P, Gagne A, Lavoie J P, Helie P (2018): Bronchoalveolar lavage fluid neutrophilia is associated with the severity of pulmonary lesions during equine asthma exacerbations. *Equine Vet J*, 50, 609-615.
- Bullone M, Lavoie J P (2015): Asthma "of horses and men"-how can equine heaves help us better understand human asthma immunopathology and its functional consequences? *Mol Immunol*, 66, 97-105.
- Bullone M, Murcia R Y, Lavoie J P (2016): Environmental heat and airborne pollen concentration are associated with increased asthma severity in horses. *Equine Vet J*, 48, 479-484.
- Cardwell J M, Smith K C, Wood J L, Newton J R (2014): Infectious risk factors and clinical indicators for tracheal mucus in British National Hunt racehorses. *Equine Vet J*, 46, 150-155.
- Christley R M, Hodgson D R, Rose R J, Hodgson J L, Wood J L, Reid S W (2001): Coughing in thoroughbred racehorses: risk factors and tracheal endoscopic and cytological findings. *Vet Rec*, 148, 99-104.

- Christley R M, Hodgson D R, Rose R J, Reid S W J, Hodgson J L (1999): Comparison of bacteriology and cytology of tracheal fluid samples collected by percutaneous transtracheal aspiration or via an endoscope using a plugged, guarded catheter. *Equine Vet J*, 31, 197-202.
- Cian F, Monti P, Durham A (2015): Cytology of the lower respiratory tract in horses: An updated review., *Equine Veterinary Education*, 27, 544-553.
- Clark C K, Lester G D, Vetro T, Rice B (1995): Bronchoalveolar lavage in horses: effect of exercise and repeated sampling on cytology. *Aust Vet J*, 72, 249-252.
- Clements J M, Pirie R S (2007): Respirable dust concentrations in equine stables. Part 1: validation of equipment and effect of various management systems. *Res Vet Sci*, 83, 256-262.
- Cordeau M E, Joubert P, Dewachi O, Hamid Q, Lavoie J P (2004): IL-4, IL-5 and IFN-gamma mRNA expression in pulmonary lymphocytes in equine heaves. *Vet Immunol Immunopathol*, 97, 87-96.
- Cote O, Clark M E, Viel L, Labbe G, Seah S Y, Khan M A, Douda D N, Palaniyar N, Bienzle D (2014): Secretoglobin 1A1 and 1A1A differentially regulate neutrophil reactive oxygen species production, phagocytosis and extracellular trap formation. *PLoS One*, 9, doi: 10.1371/journal.pone.0096217
- Couetil L L, Thompson C A (2020a): Airway Diagnostics: Bronchoalveolar Lavage, Tracheal Wash, and Pleural Fluid. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 36, 87-103.
- Couetil L, Cardwell J M, Leguillette R, Mazan M, Richard E, Bienzle D, Bullone M, Gerber V, Ivester K, Lavoie J P, Martin J, Moran G, Niedzwiedz A, Pusterla N, Swiderski C (2020b): Equine Asthma: Current Understanding and Future Directions. *Front Vet Sci*, 7, doi: 10.3389/fvets.2020.00450
- Couetil L L, Cardwell J M, Gerber V, Lavoie J P, Leguillette R, Richard E A (2016): Inflammatory Airway Disease of Horses--Revised Consensus Statement. *J Vet Intern Med*, 30, 503-515.
- Couetil L L, Denicola D B (1999): Blood gas, plasma lactate and bronchoalveolar lavage cytology analyses in racehorses with respiratory disease. *Equine Vet J Suppl*, 31, 77-82.
- Couetil L L, Hoffman A M, Hodgson J, Buechner-Maxwell V, Viel L, Wood J L N, Lavoie J-P (2007): Inflammatory Airway Disease of Horses. *J Vet Intern Med*, 21, 356-361.
- Couetil L L, Rosenthal F S, DeNicola D B, Chilcoat C D (2001): Clinical signs, evaluation of bronchoalveolar lavage fluid, and assessment of pulmonary function in horses with inflammatory respiratory disease. *Am J Vet Res*, 62, 538-546.
- Couetil L L, Ward M P (2003): Analysis of risk factors for recurrent airway obstruction in North American horses: 1,444 cases (1990–1999). *J Am Vet Med Assoc*, 223, 1645-1650.
- Curran M, Boothe D M, Hathcock T L, Lee-Fowler T (2020): Analysis of the effects of storage temperature and contamination on aerobic bacterial culture results of bronchoalveolar lavage fluid. *J Vet Intern Med*, 34, 160-165.
- Davis E, Rush B R (2002): Equine recurrent airway obstruction: pathogenesis, diagnosis,

- and patient management. *Vet Clin North Am Equine Pract.*, 18, 453-467
- Davis K U, Sheats M K (2019): Bronchoalveolar Lavage Cytology Characteristics and Seasonal Changes in a Herd of Pastured Teaching Horses. *Front Vet Sci*, 6, 74.
- Davis K U, Sheats M K (2021): The Role of Neutrophils in the Pathophysiology of Asthma in Humans and Horses. *Inflammation*, 44, 450-465.
- Davis M S, Freed A N (2001): Repeated Hyperventilation Causes Peripheral Airways Inflammation, Hyperreactivity, and Impaired Bronchodilation in Dogs. *Am J Respir Crit Care Med* 164, 785-789.
- Davis M S, Lockard A J, Marlin D J, Freed A N (2002): Airway cooling and mucosal injury during cold weather exercise. *Equine Vet J Suppl*, 34, 413-416.
- Davis M S, Williams C C, Meinkoth J H, Malayer J R, Royer C M, Williamson K K, McKenzie E C (2007): Influx of neutrophils and persistence of cytokine expression in airways of horses after performing exercise while breathing cold air. *Am J Vet Res*, 68, 185-189.
- De Lorenzi D, Masserdotti C, Bertoncillo D, Tranquillo V (2009): Differential cell counts in canine cytocentrifuged bronchoalveolar lavage fluid: a study on reliable enumeration of each cell type. *Vet Clin Pathol*, 38, 532-536.
- De Brauwer E I, Jacobs J A, Nieman F, Bruggeman C A, Wagenaar S S, Drent M (2000a): Differential cell analysis of cytocentrifuged bronchoalveolar fluid samples affected by the area counted. *Anal Quant Cytol Histol*, 22, 143-149
- De Brauwer E I, Jacobs J A, Nieman F, Bruggeman C A, Wagenaar S S, Drent M (2000b): Cytocentrifugation conditions affecting the differential cell count in bronchoalveolar lavage fluid. *Anal Quant Cytol Histol*, 22, 416-422
- De Brauwer E I, Jacobs J A, Nieman F, Bruggeman C A, Wagenaar S S, Drent M (2002): Bronchoalveolar lavage fluid differential cell count. How many cells should be counted? *Anal Quant Cytol Histol*, 24, 337-341.
- Debrue M, Hamilton E, Joubert P, Lajoie-Kadoch S, Lavoie J P (2005): Chronic exacerbation of equine heaves is associated with an increased expression of interleukin-17 mRNA in bronchoalveolar lavage cells. *Vet Immunol Immunopathol*, 105, 25-31.
- Deconto L (1985): Cytomorphologic Findings in Tracheobronchial Secretions from Horses with Acute or Chronic Pulmonary Disease. In: *Lung Function and Respiratory Diseases in The Horse/Hrsg. DEEGEN E, BEADLE, R E; Internationales Symposium, Hannover, 27-29.6.1985, 23-24*
- Deegen, E., & Klein, H.-J. (1986). Beurteilung von Blutgasparametern des arteriellen Blutes von Pferden unter besonderer Berücksichtigung der alveoloarteriellen Sauerstoffdifferenz. *Pferdeheilkunde* 2, 331-336.
- Dehard S, Bernaerts F, Peeters D, Detilleux J, McEntee K, Day M J, Clercx C (2008): Comparison of Bronchoalveolar Lavage Cytospins and Smears in Dogs and Cats. *J Am Anim Hosp Assoc*, 44, 285-294.
- Depecker M, Richard E A, Pitel P H, Fortier G, Leleu C, Courouce-Malblanc A (2014): Bronchoalveolar lavage fluid in Standardbred racehorses: influence of unilateral/bilateral profiles and cut-off values on lower airway disease diagnosis. *Vet J*, 199, 150-156.

- Derksen F J, Brown C M, Sonea I, Darren B J, Robinson N E (1989): Comparison of transtracheal aspirate and bronchoalveolar lavage in 50 horses with chronic lung disease. *Equine Vet J*, 21, 23-26.
- Derksen F J, Robinson N E (2002): Overview of the equine respiratory system, In: *Equine Respiratory Diseases/ Hrsg.: Lekeux P: Ithaca NY, 2002; International Veterinary Information Service, B0301.0302, URL: <https://www.ivis.org/library/equine-respiratory-diseases/overview-of-equine-respiratory-system>*
- Derksen F J, Scott J S, Miller D C, Slocombe R F, Robinson N E (1985): Bronchoalveolar Lavage in ponies with recurrent airway obstruction (heaves), *Am Rev Respir Dis*, 132, 1066-70
- Diekmann M, Deegen E (1990): Klinische Bedeutung der Tracheobronchialsekret-Zytologie. *Pferdeheilkunde*, 6, 101-110.
- Dixon P M (1997): Ancillary diagnostic techniques for the investigation of equine pulmonary disease. *Equine Veterinary Education*, 9, 72-80.
- Doddagowda S M, Shashidhar H A, Prasad C (2017): Leishman-Giemsa Cocktail - Is it an Effective Stain for Air Dried Cytology Smears. *J Clin Diagn Res*, 11, EC16-EC18, doi: 10.7860/JCDR/2017/25553.
- Douwes J, Thorne P, Pearce N, Heederik D (2003): Bioaerosol health effects and exposure assessment: progress and prospects. *Ann Occup Hyg*, 47, 187-200.
- Dupuis-Dowd F, Lavoie J P (2022): Airway smooth muscle remodelling in mild and moderate equine asthma. *Equine Vet J*, 54, 865-874.
- Fairbairn S M, Page C P, Lees P, Cunningham F M (1993): Early neutrophil but not eosinophil or platelet recruitment to the lungs of allergic horses following antigen exposure. *Clin Exp Allergy*, 23, 821-828.
- Fernandez N J, Hecker K G, Gilroy C V, Warren A L, Leguillette R (2013): Reliability of 400-cell and 5-field leukocyte differential counts for equine bronchoalveolar lavage fluid. *Vet Clin Pathol*, 42, 92-98.
- Fogarty U, Buckley T (1991): Bronchoalveolar lavage findings in horses with exercise intolerance. *Equine Vet J*, 23, 434-437.
- Franchini M, Gilli U, Akens M K, Fellenberg R V, Bracher V (1998): The role of neutrophil chemotactic cytokines in the pathogenesis of equine chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Vet Immunol Immunopathol*, 66, 53-65.
- Freeman K P, Roszel J F, McClure J M, Mannsman R, Patton P E, Naile S (1993): A review of cytological specimens from horses with and without clinical signs of respiratory disease. *Equine Vet J*, 25, 523-526.
- Garbyal R S, Agarwal N, Kumar P (2006): Leishman-Giemsa Cocktail An Effective Romanowsky Stain for Air-Dried Cytologic Smears. *Acta Cytol.*, 50, 403-406.
- Gerber V, Baleri D, Klukowska-Rotzler J, Swinburne J E, Dolf G (2009): Mixed inheritance of equine recurrent airway obstruction. *J Vet Intern Med*, 23, 626-630.

- 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 Vet J*, 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 Vet J*, 36, 576-582.
- Greenstreet P, Purslow, M J, Sudha R K (2002): Respiratory Specimen Types for Cytologic Diagnoses Specimen Procurement, Collection Methods, Specimen Submission, Cytopreparation, and Staining. In: *Color Atlas of pulmonary Cytopathology/ Hrsg.:* Kini S R, 1. Auflage, 6-26, New York, Springer, ISBN978-0-387-95371-7
- Hansen S, Fjeldborg J, Hansen A J, Baptiste K E (2019): Reliability of cytological evaluation of mast cells from bronchoalveolar lavage fluid in horses: Intraobserver agreement and mast cell identification. *Equine Veterinary Education*, 32, 47-52.
- Hare J E, Viel L (1998): Pulmonary Eosinophilia Associated with Increased Airway Responsiveness in Young Racing Horses. *J Vet Intern Med*, 12, 163-170.
- Haslett C (1997): Granulocyte apoptosis and inflammatory disease. *Br Med Bull*, 53, 669-683.
- Hayes A F, Krippendorff K (2007): Answering the Call for a Standard Reliability Measure for Coding Data. *Communication Methods and Measures*, 1, 77-89.
- Hermange T, Le Corre S, Bizon C, Richard E A, Courouce A (2019): Bronchoalveolar lavage fluid from both lungs in horses: Diagnostic reliability of cytology from pooled samples. *Vet J*, 244, 28-33.
- Herszberg B, Ramos-Barbon D, Tamaoka M, Martin J G, Lavoie J P (2006): Heaves, an asthma-like equine disease, involves airway smooth muscle remodeling. *J Allergy Clin Immunol*, 118, 382-388.
- Hewson J, Viel L (2002): Sampling, Microbiology and Cytology of the Respiratory Tract, In: *Equine Respiratory Diseases/ Hrsg.:* Lekeux, P, International Veterinary Information Service, Ithaca NY, 2002; B0301.0302, URL: http://www.ivis.org/special_books/Lekeux/viel/chapter_frm.asp
- Hodgson L J, Hodgson, D R (2002): Inflammatory Airway Disease, In: *Equine Respiratory Diseases/ Hrsg.:* Lekeux, P, International Veterinary Information Service, Ithaca NY, 2002; B0301.0302, URL: http://www.ivis.org/special_books/Lekeux/viel/chapter_frm.asp
- Hoffman A M, Mazan M R, Ellenberg S (1998): Association between bronchoalveolar lavage cytologic features and airway reactivity in horses with a history of exercise intolerance, *Am J Vet Res*, 59, 176-81
- Hoffman A M, Robinson N E, Wade J F (2003): *Proceedings of a Workshop on Inflammatory Airway Disease: Defining the Syndrome/ Hrsg.:* Havemeyer Foundation, 30.9.-3.10.2002, Bosten, USA, R & W Publications (Newmarket) Limited, ISSN 1472-3158
- Hoffman A M (1999): Bronchoalveolar lavage technique and cytological diagnosis of small airway inflammatory disease. *Equine Veterinary Education*, 11, 330-336.

- Hoffman A M (2008): Bronchoalveolar lavage: sampling technique and guidelines for cytologic preparation and interpretation. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 24, 423-435
- Hoffman A M, Viel L (1997): Techniques for Sampling the Respiratory Tract of Horses. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 13, 463-475.
- Holcombe S J, Jackson C, Gerber V, Jefcoat A, Berney C, Eberhardt S, Robinson N E (2001): Stabling is associated with airway inflammation in young Arabian horses. *Equine Vet J*, 33, 244-249.
- 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 Vet J*, 38, 300-304.
- Horobin R W (2011): How Romanowsky stains work and why they remain valuable - including a proposed universal Romanowsky staining mechanism and a rational troubleshooting scheme. *Biotech Histochem*, 86, 36-51.
- Horobin R W, Walter K J (1987): Understanding Romanowsky staining I: The Romanowsky-Giemsa effect in blood smears. *Histochemistry*, 86, 331-336.
- Hostetter S J, Clark S K, Gilbertie J M, Wiechert S A, Jones D E, Sponseller B A (2017): Age-related variation in the cellular composition of equine bronchoalveolar lavage fluid. *Vet Clin Pathol*, 46, 344-353.
- Hotchkiss J W, Reid S W, Christley R M (2007): A survey of horse owners in Great Britain regarding horses in their care. Part 2: Risk factors for recurrent airway obstruction. *Equine Vet J*, 39, 301-308.
- 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. *Aust Vet J*, 81, 681-684.
- Ivester K M, Couetil L L, Moore G E (2018): An observational study of environmental exposures, airway cytology, and performance in racing thoroughbreds. *J Vet Intern Med*, 32, 1754-1762.
- Ivester K M, Couetil L L, Moore G E, Zimmermann N J, Raskin R E (2014a): Environmental Exposures and Airway Inflammation in Young Thoroughbred Horses. *J Vet Intern Med*, 28, 918-924.
- Ivester K M, Couetil L L, Zimmerman N J (2014b): Investigating the link between particulate exposure and airway inflammation in the horse. *J Vet Intern Med*, 28, 1653-1665.
- Jackson C A, Berney C, Jefcoat A M, Robinson N E (2000): Environment and prednisone interactions in the treatment of recurrent airway obstruction (heaves). *Equine Vet J*, 32, 432-438.
- Jean D, Vrins A, Beauchamp G, Lavoie J P (2011): Evaluation of variations in bronchoalveolar lavage fluid in horses with recurrent airway obstruction. *Am J Vet Res*, 72, 838-842.
- Jefcoat A M, Hotchkiss J A, Gerber V, Harkema J R, Basbaum C B, Robinson N E (2001): Persistent mucin glycoprotein alterations in equine recurrent airway obstruction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 281, 704-712.

- Jörundsson E, Lumsden J H, Jacobs R M (1999): Rapid Staining Techniques in Cytopathology: A Review and Comparison of Modified Protocols for Hematoxylin and Eosin, Papanicolaou and Romanowsky Stains. *Vet Clin Pathol*, 28, 100-108.
- Kaup F J, Drommer W, Damsch S, Deegen E (1990c): Ultrastructural findings in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) 2: pathomorphological changes of the terminal airways and the alveolar region. *Equine Vet J*, 22, 349-355.
- Kaup F J, Drommer W, Damsch S, V. Scheven A, Klein O, Deegen E (1990a): Ultrastruktur der Epithelzellen im Bereich der Lunge gesunder Pferde. *Pferdeheilkunde*, 6, 147-154.
- Kaup F J, Drommer W, Deegen E (1990b): Ultrastructural findings in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) I: alterations of the larger conducting airways. *Equine Vet J* 22, 343-348.
- Kelly C, Ward C, Bird G, Hendrick D, Walter H (1989): The effect of filtration on absolute and differential cell counts in fluid obtained at bronchoalveolar lavage. *Respir Med*, 83, 107-110.
- Koblinger K, Nicol J, McDonald K, Wasko A, Logie N, Weiss M, Leguillette R (2011): Endoscopic Assessment of Airway Inflammation in Horses. *J Vet Intern Med*, 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 Vet J*, 39, 107-112.
- Koo T K, Li M Y (2016): A Guideline of Selecting and Reporting Intraclass Correlation Coefficients for Reliability Research. *J Chiropr Med*, 15, 155-163.
- Krafts K P, Pambuccian S E (2011): Romanowsky staining in cytopathology: history, advantages and limitations. *Biotech Histochem*, 86, 82-93.
- Kramer H, Windrum G M (1954): The Metachromativc Staining Reaction. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 3, 153-237.
- Kreling I, Ueberschär (2003): Ergänzende Untersuchungsmethode bei Atemwegserkrankungen der Pferde: Die Bronchoalveoläre Lavage (BAL), *Pferdespiegel*, 6, 5-9.
- Krippendorff K (2004): *Content Analysis: An Introduction to Its Methodology*. 2. Auflage, USA, Sage Publications, Inc., ISBN 0-7619-1544-3
- Landis J R, Koch G G (1977): The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics*, 33, 159-174.
- Lapointe J M, Vrins A, Lavoie J P (1994): Effects of centrifugation and specimen preparation technique on bronchoalveolar lavage analysis in horses. *Equine Vet J*, 26, 227-229.
- Lavoie J P, Maghni K, Desnoyers M, Taha R, Martin J G, Hamid Q A (2001): Neutrophilic Airway Inflammation in Horses with Heaves Is Characterized by a Th2-type Cytokine Profile. *Am J Respir Crit Care Med*, 164, 1410-1413.
- Lavoie J P (2017): Which is the most appropriate in 2017: "Mild to Severe Equine Asthma" or heaves, RAO, equine COPD, IAD, tracheal IAD, bronchial IAD, small airway disease,

- chronic bronchitis, SPACOPD, SPOPD, Summer Heaves or Summer RAO ? In: Proceedings of the World Equine Airway Symposium/ Hrsg.: World Equine Airway Society, Kopenhagen, 13.7.2017, 7-11
- Lavoie J P (2021): How to Diagnose Mild and Moderate Equine Asthma as a Cause of Poor Performance in Sport Horses. AAEP Proceedings, 67, 199-201.
- 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. J Vet Intern Med, 25, 322-329.
- Lavoie-Lamoureux A, Moran K, Beauchamp G, Mauel S, Steinbach F, Lefebvre-Lavoie J, Martin J G, Lavoie J P (2010): IL-4 activates equine neutrophils and induces a mixed inflammatory cytokine expression profile with enhanced neutrophil chemotactic mediator release ex vivo. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 299, L472-482. Doi: 10.1152/ajplung.00135.2009
- Leclere M, Desnoyers M, Beauchamp G, Lavoie J P (2006): Comparison of Four Staining Methods for Detection of Mast Cells in Equine Bronchoalveolar Lavage Fluid. J Vet Intern Med, 20, 377-381.
- Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Gelinas-Lymburner E, David F, Martin J G, Lavoie J P (2011) :Effect of antigenic exposure on airway smooth muscle remodeling in an equine model of chronic asthma. Am J Respir Cell Mol Biol, 45, 181-187.
- Leguillette R (2003): Recurrent airway obstruction--heaves. Vet Clin North Am Equine Pract, 19, 63-86.
- Mair T S, Stokes C R, Bourne F J (1987): Cellular content of secretions obtained by lavage from different levels of the equine respiratory tract Equine Vet J, 19, 458-462.
- 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. Aust Vet J, 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. Aust Vet J, 85, 414-419.
- Marcos R, Santos M, Marrinhas C, Correia-Gomes C, Caniatti M (2016): Cyto centrifuge preparation in veterinary cytology: a quick, simple, and affordable manual method to concentrate low cellularity fluids. Vet Clin Pathol, 45, 725-731.
- Matusovsky O S, Kachmar L, Ijpmma G, Bates G, Zitouni N, Benedetti A, Lavoie J P, Lauzon A M (2016): Peripheral Airway Smooth Muscle, but Not the Trachealis, Is Hypercontractile in an Equine Model of Asthma. Am J Respir Cell Mol Biol, 54, 718-727.
- May A, Gehlen H (2009): The examination of tracheal wash fluid and bronchoalveolar lavage fluid obtains important information regarding type and severity of lung diseases. Pferdeheilkunde Equine Medicine, 25, 310-320.
- Mayer P, Laber G, Walzl H (1990): Bronchoalveolar lavage in dogs; analysis of proteins and respiratory cells. Zentralbl Veterinarmed A, 37, 392-399.

- Mazan M (2018): Respiratory Secretions. In: Interpretation of Equine Laboratory Diagnostics/ Hrsg.: Pusterla N, Higgins J, 1. Auflage, 363-378, Hoboken, USA, John Wiley & Sons, Inc., ISBN 9781118922811.
- Mazan M R, Hoffman A M (2003): Clinical techniques for diagnosis of inflammatory airway disease in the horse. *Clinical Techniques in Equine Practice*, 2, 238-257.
- McGorum B C, Dixon P M (1994): The analysis and interpretation of equine bronchoalveolar lavage fluid (BALF) cytology. *Equine Veterinary Education*, 6, 203-209.
- McGorum B C, Dixon P M, Halliwell W, Irving P (1993a): Comparison of cellular and molecular components of bronchoalveolar lavage fluid harvested from different segments of the equine lung. *Res Vet Sci*, 55, 57-59.
- McGorum B C, Dixon P M, Halliwell R E W (1993b): Responses of horses affected with chronic obstructive pulmonary disease to inhalation challenges with mould antigens, *Equine Vet J*, 25, 261-267
- McGorum B C, Ellison J, Cullen R T (1998): Total and respirable airborne dust endotoxin concentrations in three equine management systems. *Equine Vet J*, 30, 430-434.
- McKane S A, Canfield P J, Rose R J (1993): Equine bronchoalveolar lavage cytology: survey of Thoroughbred racehorses in training *Aust Vet J*, 70, 401-404.
- Meyer K C, Raghu G, Baughman R P, Brown K K, Costabel U, du Bois R M, Drent M, Haslam P L, Kim D S, Nagai S, Rottoli P, Saltini C, Selman M, Strange C, Wood B, American Thoracic Society Committee on BAL in Intertitial Lung Disease (2012): An official American Thoracic Society clinical practice guideline: the clinical utility of bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 185, 1004-1014.
- Michelotto P V, Lessa D A B, Da Silva K M, Gawlowski K R S, Fernandes W R (2013): The airway fluid analysis: methods and interpretation for the athletic horse. *R. bras. Ci. Vet.*, 20, 1-5.
- Milman N, Jacobsen G K, Faurschou P, Graudal N, Jorgensen A (1993): The effect of filtration on the cellular components in bronchoalveolar lavage fluid. *Cytopathology*, 4(2), 85-89.
- Miskovic M, Couetil L L, Thompson C A (2007): Lung Function and Airway Cytologic Profiles in Horses with Recurrent Airway Obstruction maintained in Low-Dust Environments. *J Vet Intern Med*, 21, 1060-1066.
- Mordelet-Dambrine M, Arnoux A, Stanislas-Leguern G, Sandron D, Chrétien J, Huchon G (1984): Processing of Lung Lavage Fluid Causes Variability in Bronchoalveolar Cell Count. *Am Rev Respir Dis.*, 130, 305-6
- Moumouni H, Garaud P, Diot P, Lemarie E, Anihoniz P (1994): Quantification of Cell Loss during Bronchoalveolar Lavage Fluid Processing Effects of Fixation and Staining Methods. *Am J Respir Crit Care Med*, 149, 636-640.
- Murcia R Y, Vargas A, Lavoie J P (2016): The Interleukin-17 Induced Activation and Increased Survival of Equine Neutrophils Is Insensitive to Glucocorticoids. *PLoS One*, doi: 10.1371/journal.pone.0154755

- Nafe L A, DeClue A E, Reinero C R (2011): Storage alters feline bronchoalveolar lavage fluid cytological analysis. *J Feline Med Surg*, 13, 94-100.
- Nuytten J, Muylle E, Oyaert W, van den Hende C, Vlaminck K, de Keersmaecker F (1983): Cytology, bacteriology and phagocytic capacity of tracheo-bronchial aspirates in healthy horses and horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Zentralbl Veterinarmed A*, 30, 114-120.
- Ohnesorge B, Trötschel C, Deegen E (1998): Bestimmung von Totraum und expiratorischem Mischluftvolumen zur Diagnostik chronischer Lungenerkrankungen beim Pferd. *Pferdeheilkunde* 14, 450-455.
- Olave C J, Ivester K M, Couetil L L, Kritchevsky J E, Tinkler S H, Mukhopadhyay A (2021): Dust exposure and pulmonary inflammation in Standardbred racehorses fed dry hay or haylage: A pilot study. *Vet J*, 271, doi: 10.1016/j.tvjl.2021.105654
- Olszewski M A, Robinson E, Zhu F X, Zhang X Y, Tithof P K (1999): Mediators of anaphylaxis but not activated neutrophils augment cholinergic responses of equine small airways. *Am J Physiol*, 276, 522-529.
- Orard M, Depecker M, Hue E, Pitel P H, Courouce-Malblanc A, Richard E A (2016): Influence of bronchoalveolar lavage volume on cytological profiles and subsequent diagnosis of inflammatory airway disease in horses. *Vet J*, 207, 193-195.
- Ortega-Gomez A, Perretti M, Soehnlein O (2013): Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Mol Med*, 5, 661-674.
- Pacheco A P, Paradis M R, Hoffman A M, Hermida P, Sanchez A, Nadeau J A, Tufts M, Mazan M R (2014): Age Effects on Blood Gas, Spirometry, Airway Reactivity, and Bronchoalveolar Lavage Fluid Cytology in Clinically Healthy Horses. *J Vet Intern Med*, 28(2), 603-608.
- Pickles K, Pirie R S, Rhind S, Dixon P M, McGorum B C (2002a): Cytological analysis of equine bronchoalveolar lavage fluid. Part 1: Comparison of sequential and pooled aliquots. *Equine Vet J*, 34, 288-291.
- Pickles K, Pirie R S, Rhind S, Dixon P M, McGorum B C (2002b): Cytological analysis of equine bronchoalveolar lavage fluid. Part 2: comparison of smear and cytocentrifuged preparations. *Equine Vet J*, 34, 292-296.
- Pickles K, Pirie R S, Rhind S, Dixon P M, McGorum B C (2002c): Cytological analysis of equine bronchoalveolar lavage fluid. Part 3: the effect of time, temperature and fixatives. *Equine Vet J*, 34, 297-301.
- Pirie R S (2014): Recurrent airway obstruction: a review. *Equine Vet J*, 46(3), 276-288.
- Pirie R S, Collie D D, Dixon P M, McGorum B C (2002): Evaluation of nebulised hay dust suspensions (HDS) for the diagnosis and investigation of heaves. 2: Effects of inhaled HDS on control and heaves horses. *Equine Vet J*, 34, 337-342.
- Pirie R S, Collie D D S, Dixon P M, McGorum B C (2003a): Inhaled endotoxin and organic dust particulates have synergistic proinflammatory effects in equine heaves (organic dust-induced asthma). *Clin Exp Allergy*, 33, 676-683.
- Pirie R S, Couetil L L, Robinson N E, Lavoie J P (2016): Equine asthma: An appropriate, translational and comprehensible terminology? *Equine Vet J*, 48, 403-405.

- Pirie R S, Dixon P M, Collie D D S, McGorum B C (2001): Pulmonary and systemic effects of inhaled endotoxin in control and heaves horses. *Equine Vet J*, 33, 311-318.
- Pirie R S, Dixon P M, McGorum B C (2003b): Endotoxin contamination contributes to the pulmonary inflammatory and functional response to *Aspergillus fumigatus* extract inhalation in heaves horses *Clin Exp Allergy*, 33, 1289-1296.
- Pirie, S. R. (2017). Mild to moderate equine asthma — an overview. *Livestock*, 22, 158-163.
- Pischinger A (1925): Die Lage des isoelektrischen Punktes histologischer Elemente als Ursache ihrer verschiedenen Färbbarkeit. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 3, 169-197
- Racklyeft D J, Love D N (2006): Influence of head posture on the respiratory tract of healthy horses. *Aust Vet J*, 67, 402-405.
- Raidal S L, Bailey G D, Love D N (1997): Effect of transportation on lower respiratory tract contamination and peripheral blood neutrophil function. *Aust Vet J*, 75, 433-438.
- Richard E A, Depecker M, Defontis M, Leleu C, Fortier G, Pitel P H, Courouce-Malblanc A (2014): Cytokine concentrations in bronchoalveolar lavage fluid from horses with neutrophilic inflammatory airway disease. *J Vet Intern Med*, 28(6), 1838-1844.
- 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 Vet J*, 41, 384-389.
- Richard E A, Fortier G D, Lekeux P M, Van Erck E (2010): Laboratory findings in respiratory fluids of the poorly-performing horse. *Vet J.*, 185, 115-22.
- Robinson N E (2001): International Workshop on Equine Chronic Airway Disease Michigan State University. *Equine Vet J*, 33, 5-19.
- Robinson N E, Berney C, Eberhart S, deFeijter-Rupp H L, Jefcoat A M, Cornelisse C J, Gerber V M, Derksen, F. J. (2003). Coughing, mucus accumulation, airway obstruction, and airway inflammation in control horses and horses affected with recurrent airway obstruction. *Am J Vet Res*, 64, 550-557.
- Robinson N E, Derksen F J, Olszewski M, Berney C, Boehler D, Matson C, Hakala J (1999): Determinants of the Maximal Change in Pleural Pressure during Tidal Breathing in COPD-Affected Horses. *Vet J*, 157, 160–165. <https://doi.org/10.1053/tvj.1998.0281>.
- Robinson N E, Karmaus W, Holcombe S J, Carr E A, Derksen F J (2006): Airway inflammation in Michigan pleasure horses: prevalence and risk factors. *Equine Vet J*, 38, 293-299.
- Robinson-Smith T M, Saad A, Baughman R P (2004): Interpretation of the Wright-Giemsa Stained Bronchoalveolar Lavage Specimen. *Laboratory Medicine*, 35(9), 553-557.
- Rossi H, Virtala A M, Raekallio M, Rahkonen E, Rajamaki M M, Mykkanen A (2018): Comparison of Tracheal Wash and Bronchoalveolar Lavage Cytology in 154 Horses With and Without Respiratory Signs in a Referral Hospital Over 2009-2015. *Front Vet Sci*, 5, 61.
- Rush B, Mair T (2004): *Equine Respiratory Diseases*, 1. Auflage, Blackwell Science Ltd, ISBN 0-632-05262-7

- Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser M A, Lochnit G, Barreto G, Galuska S P, Lohmeyer J, Preissner K T (2012): Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS One*, 7, doi: 10.1371/journal.pone.0032366
- Samadi S, Wouters I M, Houben R, Jamshidifard A R, Van Eerdenburg F, Heederik D J (2009): Exposure to inhalable dust, endotoxins, beta(1->3)-glucans, and airborne microorganisms in horse stables. *Ann Occup Hyg*, 53, 595-603.
- Santos N F d S d, Viscardi V, Caruso A C P, Torres Filho R d A, Alencar N X d, Lessa D A B (2016): Equine Tracheobronchial Wash Filtration and Its Effects on Differential Cell Count. *Ciência Animal Brasileira*, 17, 274-278.
- Schuchmacher-Kuckelkorn R, Atra A, Belli M L, den Engelsman G, Fréneaux P, Gauthier A, Heijlaerts-Klever A, Scuderi F, Peris L S, Tewari S, Zapletal O, Ernst A, Berthold F (2021): The reliability of bone marrow cytology as response criterion in metastatic neuroblastoma, *Pediatr Blood Cancer*, 68, e28819., doi: 10.1002/psc.28819.
- Schulte E (1986): Air drying as a preparatory factor in cytology: investigation of its influence on dye uptake and dye binding. *Diagn Cytopathol*, 2, 160-167.
- Schwarz B, Kühn H (2021): TBS- und BAL-Zytologie – Es ist nicht immer Equines Asthma. *Pferdespiegel* 24, 156-161.
- Setlakwe E L, Lemos K R, Lavoie-Lamoureux A, Duguay J D, Lavoie J P (2014): Airway collagen and elastic fiber content correlates with lung function in equine heaves. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 307, L252-260, doi: 10.1152/ajplung.00019.2014
- Stanzel F (2013): Bronchoalveolar Lavage. In *Principles and Practice of Interventional Pulmonology*/Hrsg.: Ernst A, Herth F J F, 1. Auflage, 165-176, New York: Springer, ISBN978-1-4614-4291-2
- Sweeney C R, Rossier Y, Ziemer E L, Lindborg S R (1992): Effects of lung site and fluid volume on results of bronchoalveolar lavage fluid analysis in horses, *Am J Vet Res*, 53, 1376-9
- Sweeney C R, Rossier Y, Ziemer E L, Lindborg S R (1994): Effect of prior lavage on bronchoalveolar lavage fluid cell population of lavaged and unlavaged lung segments in horses, *Abstract. Am J Vet Res*, 55, 1501-1504.
- Tammemagi M C, Frank J W, Leblanc M, Artsob H (1995): Intra- and interlaboratory reproducibility of an ELISA serological test for Lyme disease, *Can J Infect Dis*, 6, 90-95.
- Tee S Y, Dart A J, MacDonald M H, Perkins N R, Horadagoda N, Jeffcott L B (2012): Effects of collecting serial tracheal aspirate and bronchoalveolar lavage samples on the cytological findings of subsequent fluid samples in healthy Standardbred horses. *Aust Vet J*, 90, 247-251.
- Tesarowski D B, Viel L, McDonnell W N, Pulmonary function measurements during repeated environmental challenge of horses with recurrent airway obstruction (heaves) (1996), *American Journal of Veterinary Research*, 57, 1214-1219
- Thelm H, Diem H, Haferlach T (2004): *Color Atlas of hematology - Practical microscopic und clinical diagnosis*, 2. Auflage, Stuttgart: Thieme, ISBN: 9783136731024

- Thompson A B, Teschler H, Wang Y M, Konietzko N, Costabel U (1996): Preparation of bronchoalveolar lavage fluid with microscope slide smears. *Eur Respir J*, 9, 603-608.
- Tremblay G M, Ferland C, Lapointe J M, Vrins A, Lavoie J P, Cormier W (1993): Effect of stabling on bronchoalveolar cells obtained from normal and COPD horses. *Equine Vet J*, 25, 194-197.
- Tyler R D, Cowell R L, McAllister C G, Morton R J, Caruso K J (2001): Introduction, In: *Diagnostic Cytology and Hematology of the Horse*/Cowell R L, Tyler R D, 2. Auflage, 73-86; Massachusetts: Mosby. Inc.- ISBN: 0-323-01317-1
- Uberti B, Moran G (2018): Role of neutrophils in equine asthma. *Anim Health Res Rev*, 19, 65-73.
- Warke T J, Kamath S, Fitch P S, Brown V, Shields M D, Ennis M (2001): The repeatability of nonbronchoscopic bronchoalveolar lavage differential cell counts. *Eur Respir J*, 18, 1009-1012.
- Wasko A J, Barkema H W, Nicol J, Fernandez N, Logie N, Leguillette R (2011): Evaluation of a risk-screening questionnaire to detect equine lung inflammation: results of a large field study. *Equine Vet J*, 43, 145-152.
- Wenisch T, Fey K, Sasse H H L (2001): Zum Einfluss der Präparaterstellung und Lagerung auf die absolute Zellzahl und das Differenzialzellbild der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) beim Pferd. *Tierärztliche Praxis*, 29, 249-255.
- Westermann C M, Laan T T, van Nieuwstadt R A, Bull S, Fink-Gremmels J (2005): Effects of antitussive agents administered before bronchoalveolar lavage in horses. *Am J Vet Res*, 66, 1420-1424.
- Whitwel K E, Greet, T R C (1984): Collection and evaluation of tracheobronchial washes in the horse. *Equine Vet J*, 16, 499-508.
- 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. *Vet J*, 182, 430-435.
- Willoughby R A, Gayle L E, McKee S L, Riddolls L J (1991): Use of Scintigraphy for the Determination of Mucociliary Clearance Rates in Normal, Sedated, Diseased and Exercised Horses. *Can J Vet Res* 55, 315-320.
- Wittekind D (1979): On the nature of Romanowsky dyes and the Romanowsky-Giemsa effect. *Clin Lab Haematol*, 1, 247-262.
- Wittekind D, Kretschmer V, Löhr W (1976): Kann Azur B-Eosin die May-Grünwald-Giemsa-Färbung ersetzen? *Blut*, 32, 71-78
- Wolff R K, Dolovich M B, Obminski G, Newhouse M T (1977): Effects of exercise and eucapnic hyperventilation on bronchial clearance in man. *Applied Physiol* 43, 46-50.
- Woods K S, Defarges A M, Abrams-Ogg A C, Viel L, Brisson B A, Bienzle D (2014): Comparison of manual and suction pump aspiration techniques for performing bronchoalveolar lavage in 18 dogs with respiratory tract disease. *J Vet Intern Med*, 28, 1398-1404.

Xaubet A, Moises J A, Agusti C, Martos J A, Picado C (1991): Identification of mast cells in bronchoalveolar lavage fluid, Comparison between different fixation and staining methods. *Allergy*, 46, 222-227.

Yu M F, Wang Z W, Robinson E, Derkson F J (1994): Modulation of bronchial smooth muscle function in horses with heaves. *J Appl Physiol* 77, 2149-2154.

Zinkl J G (2001): Lower Respiratory Tract, In: *Diagnostic Cytology and Hematology of the Horse*/Hrsg.: Cowell R L, Tyler R D, 2. Auflage, 73-86; Massachusetts: Mosby. Inc.- ISBN: 0-323-01317-1

Zipfel E, Grezes J R, Seiffert W, Zimmermann H W (1981): Über Romanowsky-Farbstoffe und den Romanowsky-Giemsa-Effekt 1. Mitteilung: Azur B, Reinheit und Gehalt von Farbstoffen, Assoziation. *Histochemistry* 72, 279-290.

10 Anhang

Tabellenverzeichnis

- Tab. 1: Signalement und klinische Befunde der Studienpferde.
- Tab. 2: Ergebnisse der endoskopischen Untersuchung, der aBGA, der zytologischen Untersuchung und der Hämatologie.
- Tab. 3: Mikrobiologische Befunde der Studienpferde.
- Tab. 4: Beurteilungsschemata Tracheobronchialsekret – alle Labore.
- Tab. 5: Beurteilungsschemata der Bronchoalveolären Lavage – alle Labore.
- Tab. 6: Zytologische Befunde der gesunden Pferde im Rahmen der Atemwegsuntersuchung.
- Tab. 7: Zytologische Befunde der Pferde mit MEA im Rahmen der Atemwegsuntersuchung.
- Tab. 8: Zytologische Befunde der Pferde mit SEA im Rahmen der Atemwegsuntersuchung.
- Tab. 9: Intraindividuelle Varianz der Ergebnisse zur Zellzahl in der BAL.
- Tab. 10: Intraindividuelle Varianz der Ergebnisse zu eosinophilen Granulozyten in der BAL.
- Tab. 11: Intraindividuelle Varianz der Ergebnisse zum Mukus in der BAL.
- Tab. 12: Intraindividuelle Varianz der Ergebnisse zu den Curschmannspiralen in der BAL.
- Tab. 13: Intraindividuelle Varianz der Ergebnisse zu Epithelzellen in der BAL.
- Tab. 14: Intraindividuelle Varianz der Ergebnisse zu mehrkernigen Zellen in der BAL.
- Tab. 15: Intraindividuelle Varianz der Ergebnisse zu den Bakterien in der BAL.
- Tab. 16: Intraindividuelle Varianz der Ergebnisse zum Fremdmaterial in der BAL.
- Tab. 17: Intraindividuelle Varianz der Ergebnisse zu den eosinophilen Granulozyten im TBS.
- Tab. 18: Intraindividuelle Varianz der Ergebnisse zu mehrkernigen Zellen im TBS.
- Tab. 19: Intraindividuelle Varianz der Ergebnisse zu den Epithelzellen im TBS.
- Tab. 20: Intraindividuelle Varianz der Ergebnisse zu den Bakterien im TBS.
- Tab. 21: Intraindividuelle Varianz der Ergebnisse zum Fremdmaterial im TBS.
- Tab. 22: Intraindividuelle Varianz der Ergebnisse zur Zellzahl im TBS.
- Tab. 23: Intraindividuelle Varianz der Ergebnisse zum Mukus im TBS.
- Tab. 24: Intraindividuelle Varianz der Ergebnisse zu Curschmannspiralen im TBS.
- Tab. 25: Interindividuelle Varianz der Ergebnisse im TBS und der BAL.
- Tab. 26: Befundergebnisse Labor 1 gesunde Pferde.
- Tab. 27: Befundergebnisse Labor 1 Pferde mit MEA.
- Tab. 28: Befundergebnisse Labor 1 Pferde mit SEA.
- Tab. 29: Befundergebnisse Labor 2 gesunde Pferde.
- Tab. 30: Befundergebnisse Labor 2 Pferde mit MEA.
- Tab. 31: Befundergebnisse Labor 2 Pferde mit SEA.
- Tab. 32: Befundergebnisse Labor 3 gesunde Pferde.
- Tab. 33: Befundergebnisse Labor 3 Pferde mit MEA.
- Tab. 34: Befundergebnisse Labor 3 Pferde mit SEA.
- Tab. 35: Befundergebnisse Labor 4 gesunde Pferde.
- Tab. 36: Befundergebnisse Labor 4 Pferde mit MEA.
- Tab. 37: Befundergebnisse Labor 4 Pferde mit SEA.
- Tab. 38: Befundergebnisse Labor 5 Untersucher A gesunde Pferde.
- Tab. 39: Befundergebnisse Labor 5 Untersucher A Pferde mit MEA.
- Tab. 40: Befundergebnisse Labor 5 Untersucher A Pferde mit SEA.
- Tab. 41: Befundergebnisse Labor 5 Untersucher B gesunde Pferde.
- Tab. 42: Befundergebnisse Labor 5 Untersucher B Pferde mit MEA.
- Tab. 43: Befundergebnisse Labor 5 Untersucher B Pferde mit SEA.

Tabelle 1: Signalement und klinische Befunde der Studienpferde, Punkteverteilung n. Seite, IKT: Innere Körpertemperatur.

Pferd	Rasse	Alter in Jahren	Geschlecht	Atemfrequenz	Nasen-ausfluss	Husten	Atmung	IKT	Auskultation	Perkussion
1	Traber	12	Stute	1	0	0	0	37,0	0	0
2	Trakehner	16	Stute	1	0	0	0	37,3	0	0
3	Trakehner	15	Stute	1	1	0	0	37,2	0	0
4	Haflinger	11	Stute	1	0	0	0	37,3	1	0
5	Haflinger	11	Stute	1	0	0	0	37,5	1	0
6	Lusitano	21	Wallach	1	1	0	1	37,6	0	2
7	deutsches Sportpferd	9	Stute	1	1	0	1	37,9	1	1
8	Oldenburger	10	Wallach	1	0	1	0	37,1	0	3
9	Sachsen Anhaltiner	10	Stute	1	1	1	0	37,6	1	1
10	Deutsches Reitpony	8	Wallach	2	0	2	1	37,6	0	0
11	Brandenburger	20	Wallach	1	1	0	0	37,6	1	0
12	Lewitzer	9	Stute	2	1	1	1	37,5	0	1
13	deutsches Sportpferd	15	Stute	1	0	0	0	37,3	0	2
14	Pinto	11	Wallach	2	1	1	1	38,0	1	2
15	Isländer	21	Wallach	2	1	0	2	37,8	2	1

Punkte für die Tabellen 1 und 2 wurden wie folgt vergeben:

Atemfrequenz	1 = bis 16 Atemzüge/min 2 = über 16	Bifurkatio	0 = ohne besonderen Befund 1 = ggr. verdickt 2 = deutlich verdickt
Atemzügen/min			
Nasenausfluss	0 = nicht vorhanden 1 = vorhanden		
Husten	0 = kein Husten 1 = spontan 2 = auslösbar		
Atmung	0 = costoabdominal 1 = abdominal verstärkt 2 = Dampfrinne		
Auskultation	0 = ohne besonderen Befund 1 = geringgradig inspiratorisch verschärfte Atmung 2 = hochgradig inspiratorisch verschärfte Atmung 3 = Giemen/Rasseln/Knistern		
Perkussion	0 = ohne besonderen Befund 1 = ½ handbreit vergrößert 2 = 1 handbreit vergrößert 3 = 2 handbreit vergrößert		

Tabelle 2: Ergebnisse der endoskopischen Untersuchung, der aBGA, der zytologischen Untersuchung und der Hämatologie, Punkteverteilung s. vorherige Seite.

Pferd	Sekret- menge	Sekret- viskosität	Bifurkatio	pO₂ [mmHg]	pCO₂ [mmHg]	AaDO2	Leukozyten (G/L)	SAA	BALF Neutrophile (%)
1	0	0	0	96	49	4,37	7,68	2,58	2,7
2	0	0	0	102	49	-1,62	6,58	4,37	1,7
3	1,5	2	1	96	40	13,37	6,03	2,13	2,3
4	2	2	0	108	44	-2,63	8,24	0,4	2,5
5	0	0	1	111	38	0,37	9,69	0,1	2,6
6	2	2,5	1	102	42	4,75	8,47	13,37	2
7	1	2	0	96	48	4,75	8,79	1,94	29
8	1	1	0	99	45	4,75	3,25	445,62	26
9	2	2	1	95	42	11,75	10,91	0,1	31
10	3	4	1	73	48	27,75	10,09	4,24	23
11	4	4	1	98	46	4,75	nicht gemessen	nicht gemessen	82,5
12	4,5	3,5	1	82	44	22,75	9,74	33,81	35,8
13	4	3	1	82	43	23,75	9,41	3,58	31
14	3	5	1	99	42	7,75	7,21		30
15	2	3,5	2	84	48	16,75	6,96	<10	57,8

Tabelle 3: Mikrobiologische Befunde der Studienpferde.

Pferd	mikrobiologischer Befund aus dem TBS
1	keine Bakterien nachgewiesen
2	ggr. unspezifischer Keimgehalt in Mischkultur, u.a. vereinzelt <i>Pseudomonas koreensis</i> , <i>Acinetobakter johnsonii</i> , keine Anaerobier
3	mittelgradiger, vermutlich unspezifischer Keimgehalt in Mischkultur u.a.: <i>Klebsiella oxytoca</i> +, <i>Kluyvera cryocrescens</i> , keine Anaerobier, beta-hämolyisierende <i>Strep. Equi ssp. Zooepidemicus</i>
4	keine spezifisch pathogenen Keime nachgewiesen
5	sehr vereinzelt <i>Strep. Equi spp. Zooepidemicus</i> , vereinzelt <i>Actinobacillus rossii</i> , keine Anaerobier
6	vereinzelt <i>Bacillus pumilus</i> nachgewiesen
7	keine spezifischen pathogenen Bakterien nachgewiesen (vereinzelt <i>Bacillus pumilus</i>)
8	ggr. vermutlich unspezifischer Keimgehalt in Mischkultur u.a. <i>Actinobacillus equuli</i>
9	keine vermehrungsfähigen Bakterien nachgewiesen (vereinzelt <i>Bacillus sp.</i>)
10	keine vermehrungsfähigen Bakterien nachgewiesen
11	keine vermehrungsfähigen Bakterien nachgewiesen
12	keine vermehrungsfähigen Bakterien nachgewiesen
13	keine spezifischen pathogenen Bakterien nachgewiesen (vereinzelt <i>Bacillus sp.</i>)
14	keine vermehrungsfähigen Bakterien nachgewiesen
15	hgr. Keimgehalt in Mischkultur, u.a. <i>Actinobacillus sp.</i> , keine Anaerobier

Tabelle 4: Beurteilungsschemata Tracheobronchialsekret – alle Labore.

Parameter	Labor 1		Labor 2		Labor 3		Labor 4		Labor 5	
Zellzahl	1	ggr.	1	ggr.	1	ggr.	1	ggr.	1	ggr.
	2	mgr.	2	mgr.	2	mgr.	2	mgr.	2	mgr.
	3	hgr.	3	hgr.	3	hgr.	3	hgr.	3	hgr.
					4	sehr hoch				
Alveolar- makrophagen	1	vereinzelt	1	vereinzelt	%		%		1	ggr.
	2	wenig	2	ggr.					2	mgr.
	3	einige	3	mgr.					3	hgr.
	4	zahlreich	4	hgr.						
	5	etliche	5	dominierend						
	6	massenhaft								
neutrophile Granulozyten	1	vereinzelt	1	vereinzelt	%		%		1	vereinzelt
	2	wenig	2	ggr.					2	ggr.
	3	einige	3	mgr.					3	mgr.
	4	zahlreich	4	hgr.					4	hgr.
	5	etliche	5	dominierend					5	dominieren
	6	massenhaft								
Lymphozyten	1	vereinzelt	1	vereinzelt	%		%		1	vereinzelt
	2	wenig	2	ggr.					2	ggr.
	3	einige	3	mgr.					3	mgr.
	4	zahlreich	4	hgr.					4	hgr.
	5	etliche	5	dominierend					5	dominierend
	6	massenhaft								
eosinophile Granulozyten	1	vereinzelt	1	vereinzelt	Keine Werte		1	<1%	1	vereinzelt
	2	wenig	2	ggr.			2	>1%	2	ggr.
	3	einige	3	mgr.			3	mgr.		
	4	zahlreich	4	hgr.			4	hgr.		
	5	etliche								

Anhang

doppel- /mehrkernige Zellen	1	vereinzelt	1	vereinzelt	1	wenig	Keine Angaben		1	vereinzelt
	2	wenig	2	ggr.	2	einige			2	ggr.
	3	einige	3	mgr.					3	mgr.
	4	zahlreich	4	hgr.					4	hgr.
Mucus	1	ggr.	1	ggr.	1	ggr.	%		1	ggr.
	2	mgr.	2	mgr.	2	mgr.			2	mgr.
	3	hgr.	3	hgr.	3	hgr.			3	hgr.
Epithelzellen	1	vereinzelt	1	vereinzelt	1	vereinzelt	%		1	ggr.
	2	wenige	2	ggr.	2	ggr.			2	mgr.
	3	einige	3	mgr.	3	mgr.			3	hgr.
	4	zahlreich, häufig	4	hgr.	4	zahlreich				
			5	dominierend						
Curschmannspi- ralen	1	vereinzelt	1	vereinzelt	1	wenige	Keine Angaben		1	vereinzelt
	2	wenig	2	ggr.	2	einige			2	ggr.
	3	einige	3	mgr.	3	zahlreich			3	mgr.
									4	hgr.
Bakterien	1	intrazellulär	1	intrazellulär	1	intrazellulär	1	intrazellulär	1	intrazellulär
	2	extrazellulär	2	extrazellulär	2	extrazellulär	2	extrazellulär	2	extrazellulär
					3	intra- und extrazellulär				
Fremdmaterial	1	vorhanden	1	vorhanden	1	vorhanden	Keine Angaben		1	vorhanden

Tabelle 5: Beurteilungsschemata der Bronchoalveolären Lavage – alle Labore.

Parameter	Labor 1		Labor 2		Labor 3	Labor 4		Labor 5
Alveolarmakrophagen	1	vereinzelt	1	vereinzelt	%	%		%
	2	wenig	2	ggr.				
	3	einige	3	mgr.				
	4	zahlreich	4	hgr.				
	5	etlich	5	dominierend				
	6	massenhaft						
neutrophile Granulozyten	1	vereinzelt	1	vereinzelt	%	%		%
	2	wenig	2	ggr.				
	3	einige	3	mgr.				
	4	zahlreich	4	hgr.				
	5	etlich	5	dominierend				
	6	massenhaft						
Lymphozyten	1	vereinzelt	1	vereinzelt	%	%		%
	2	wenig	2	ggr.				
	3	einige	3	mgr.				
	4	zahlreich	4	hgr.				
	5	etlich	5	dominierend				
	6	massenhaft						
eosinophile Granulozyten	1	vereinzelt	1	vereinzelt	%	1	<1%	%
	2	wenig	2	ggr.		2	>1%	
	3	einige	3	mgr.				
	4	zahlreich	4	hgr.				
	5	etlich						
Mastzellen	1	vereinzelt	Keine Angaben		%	1	<2%	%
	2	wenige				2	>2%	
	3	einige						

Anhang

doppel- /mehrkernige Zellen	1	vereinzelt	1	vereinzelt	1	vereinzelt	Keine Angaben	1	vorhanden
	2	wenig	2	ggr.	2	wenige			
	3	einige	3	mgr.	3	einige			
			4	hgr.					
Epithelzellen	1	vereinzelt	1	vereinzelt	1	vereinzelt	%	1	ggr.
	2	wenig	2	ggr.	2	ggr.		2	mgr.
	3	einige	3	mgr.	3	Mgr.		3	hgr.
	4	zahlreich, häufig	4	hgr.	4	zahlreich			
			5	dominierend					
Mucus	siehe TBS								
Curschmannspi- ralen	1	vereinzelt	1	vereinzelt	1	wenig	Keine Angaben	1	vorhanden
	2	wenig	2	ggr.	2	einige			
	3	einige	3	mgr.	3	zahlreich			
Bakterien, Zellzahl, Fremdmaterial	siehe TBS								

Tab.6: Zytologische Befunde der gesunden Studienpferde im Rahmen der Atemwegsuntersuchung.

Pferde		1	2	3	4	5
TBS	Zelldichte	ggr.-mgr.	ggr.-mgr.	ggr.-mgr.	ggr.-mgr.	ggr.-mgr.
	Makrophagen	mgr. (nicht aktiv)	mgr. (wenig aktiv)	hgr. (wenig aktiv)	mgr. (wenig aktiv)	ggr.
	Neutrophile	keine	ggr.	keine	vereinzelt	keine
	Lymphozyten	keine	keine	keine	keine	keine
	Eosinophile	keine	keine	keine	keine	keine
	Mukus	ggr.	mgr.	mgr.	mgr.	ggr.
	Bakterien	keine	keine	keine	keine	keine
	Fremdmaterial	vorhanden	vorhanden	keins	vorhanden	keins
	Curschmannspiralen	keine	vereinzelt	keine	keine	keine
Epithelzellen	ggr.	ggr.	mgr.	keine	ggr.-mgr.	
BAL	Zelldichte	ggr.-mgr.	ggr.-mgr.	ggr.-mgr.	ggr.-mgr.	ggr.-mgr.
	Makrophagen in %	28,3 (z.T. schaumig und in Phagozytose)	58,4 (wenig aktiv)	31,3% (viele Riesenzellen)	67% (sehr vereinzelt Riesenzellen)	61,4 (wenig aktiv)
	Neutrophile in %	2,7	1,7	2,3	2,5	2,6
	Lymphozyten in %	68	40	66,3	31,5	36
	Eosinophile in %	1	0	0	0	0
	Mastzellen in %	0	0	0	0	0
	Mukus	ggr.	ggr.	mgr.	ggr.	mgr.
	Bakterien	keine	keine	keine	keine	keine
	Fremdmaterial	vorhanden	keins	vorhanden	keins	keins
Curschmannspiralen	keine	keine	keine	keine	keine	
Epithelzellen	keine	keine	keine	keine	keine	

Tab.7: Zytologische Befunde der Studienpferde mit MEA im Rahmen der Atemwegsuntersuchung.

Pferde		6	7	8	9	11
TBS	Zelldichte	ggr.	mgr.	ggr.	hgr.	hgr.
	Makrophagen	mgr. (z.T. aktiviert)	mgr. (viele aktiviert)	ggr.	ggr.	ggr., schaumig
	Neutrophile	ggr.	ggr.-mgr.	ggr.	hgr.-dominierend	hgr.
	Lymphozyten	mgr.	keine	keine	keine	keine
	Eosinophile	keine	keine	keine	keine	keine
	Mucus	ggr.	mgr.	mgr.		hgr.
	Bakterien	keine	keine	vereinzelt	intrazellulär	keine
	Fremdmaterial	keins	vorhanden	vorhanden	keins	keins
	Curschmannspiralen	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe
Epithelzellen	mgr.	hgr.	mgr.-hgr.	keine	keine	
BAL	Zelldichte	mgr.	mgr.	mgr.	mgr.	hgr.
	Makrophagen in %	49,8 (z.T. mehrkernig)	37,5 (teilweise aktiv)	35%	40%	10,8% (z.T. schaumig)
	Neutrophile in %	2	29	26	31	82,5
	Lymphozyten in %	48,2	34	38	28	4,75
	Eosinophile in %	0	0	0	0	2
	Mastzellen in %	0	0	1	1	0
	Mucus	ggr.	mgr.	mgr.	mgr.	hgr.
	Bakterien	keine	keine	keine	keine	keine
	Fremdmaterial	keins	intrazellulär	keins	keins	vorhanden
	Curschmannspiralen	Keine Angaben	Keine Angaben	Keine Angaben	Keine Angaben	Keine Angaben
Epithelzellen	keine	keine	keine	keine	keine	

Tab.8: Zytologische Befunde der Studienpferde mit SEA im Rahmen der Atemwegsuntersuchung.

	Pferde	10	12	13	14	15
TBS	Zelldichte	hgr.	ggr.-mgr.	hgr.	mgr.	hgr.
	Makrophagen	ggr.	ggr. (einzelne Riesenzellen)	ggr.	mgr.	ggr.
	Neutrophile	dominierend	hgr.	hgr.	mgr.	hgr.
	Lymphozyten	keine	keine	keine	keine	ggr.
	Eosinophile	keine	keine	keine	keine	keine
	Mukus	hgr.	mgr.	mgr.	hgr.	ggr.
	Bakterien	keine	keine	vereinzelt intrazellulär	vereinzelt intrazellulär	intra- und extrazellulär
	Fremdmaterial	keins	vorhanden	keins	keins	keins
	Curschmannspiralen	keine	keine	ggr.-mgr.	keine	keine
	Epithelzellen	keine	keine	keine	keine	ggr.-mgr.
BAL	Zelldichte	hgr.	ggr.-mgr.	ggr.-mgr.	ggr.-mgr.	ggr.-mgr.
	Makrophagen in %	55 (z.T. schaumig)	32,6	32	36	13,8
	Neutrophile in %	23	35,8	31	30	57,8
	Lymphozyten in %	21,5	29,2	37	33,75	26,8
	Eosinophile in %	0,5	2,2	0	0	1,75
	Mastzellen in %	0	0	0	0,25	0
	Mukus	hgr.	mgr.	mgr.	ggr.	hgr.
	Bakterien	keine	keine	keine	keine	keine
	Fremdmaterial	keins	keins	keins	keins	keins
	Curschmannspiralen	vereinzelt	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe
Epithelzellen	keine	keine	keine	keine	keine	

Tabelle 9: Intraindividuelle Varianz der Ergebnisse zur Zellzahl in der BAL durch die Labore 1-5 (in Klammern Angabe des 95%-Konfidenzintervalls, dick gedruckte Werte zeigen eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse an).

Labore	BAL	statistisches Maß
1	0,54 (0,18-0,899)	gewichtetes Kappa
2	0,048 (-0,391-0,486)	gewichtetes Kappa
3	nicht auswertbar	gewichtetes Kappa
4	0,268 (-0,196-0,733)	gewichtetes Kappa
5a	0,741 (0,442-1,039)	gewichtetes Kappa
5b	0,783 (0,495-1,071)	gewichtetes Kappa

Tabelle 10: Intraindividuelle Varianz der Ergebnisse zu eosinophilen Granulozyten in der BAL durch die Labore 1-5 sowie der Mastzellen für Labor 4 (in Klammern Angabe des 95%-Konfidenzintervalls).

Labore	BAL	statistisches Maß
1	-0,098 (-0,236-0,041)	gewichtetes Kappa
2	0,118 (-0,345-0,58)	gewichtetes Kappa
3	nicht auswertbar	gewichtetes Kappa
4	-0,071 (-0,17-0,027)	gewichtetes Kappa
5a	0,963 (0,885-0,988)	ICC
5b	0,63 (-0,132-0,872)	ICC
4 (Mastzellen)	-0,071 (-0,17-0,027)	gewichtetes Kappa

Tabelle 11: Intraindividuelle Varianz der Ergebnisse zum Mukus in der BAL durch die Labore 1-5 (in Klammern Angabe des 95%-Konfidenzintervalls).

Labore	BAL	statistisches Maß
1	0,189 (-0,184-0,562)	gewichtetes Kappa
2	0,107 (-0,31-0,524)	gewichtetes Kappa
3	nicht auswertbar	gewichtetes Kappa
4	0,225 (-0,18-0,63)	gewichtetes Kappa
5a	0,395 (0,072-0,718)	gewichtetes Kappa
5b	0,173 (-0,257-0,603)	gewichtetes Kappa

Tabelle 12: Intraindividuelle Varianz der Ergebnisse zu den Curschmannspiralen in der BAL durch die Labore 1-5 (in Klammern Angabe des 95%-Konfidenzintervalls).

Labore	BAL	statistisches Maß
1	-0,2 (-0,3- -0,034)	gewichtetes Kappa
2	0,359 (0,087-0,631)	gewichtetes Kappa
3	nicht auswertbar	gewichtetes Kappa
4	nicht auswertbar	gewichtetes Kappa
5a	nicht auswertbar	gewichtetes Kappa
5b	nicht auswertbar	gewichtetes Kappa

Tabelle 13: Intraindividuelle Varianz der Ergebnisse zu Epithelzellen in der BAL durch die Labore 1-5 (in Klammern Angabe des 95%-Konfidenzintervalls).

Labore	BAL	statistisches Maß
1	0,368 (0,12-0,724)	gewichtetes Kappa
2	0,308 (-0,017-0,632)	gewichtetes Kappa
3	nicht auswertbar	gewichtetes Kappa
4	0,449 (-0,64-0,815)	ICC
5a	Nicht auswertbar	gewichtetes Kappa
5b	-0,258 (-0,677-0,161)	gewichtetes Kappa

Tabelle 14: Intraindividuelle Varianz der Ergebnisse zu doppel- und mehrkernigen Zellen in der BAL durch die Labore 1-5 (in Klammern Angabe des 95%-Konfidenzintervalls).

Labore	BAL	statistisches Maß
1	0,189 (0,18-0,997)	gewichtetes Kappa
2	-0,17 (-0,316- -0,024)	gewichtetes Kappa
3	0,286 (-0,112-0,68)	gewichtetes Kappa
4	keine Angaben	
5a	0,109 (-0,279-0,497)	gewichtetes Kappa
5b	0,328 (-0,175-0,832)	gewichtetes Kappa

Tabelle 15: Intraindividuelle Varianz der Ergebnisse zu den Bakterien in der BAL durch die Labore 1-5.

Labore	BAL	statistisches Maß
1	nicht auswertbar	Cohens Kappa
2	-0,111	Cohens Kappa
3	nicht auswertbar	Cohens Kappa
4	nicht auswertbar	Cohens Kappa
5a	nicht auswertbar	Cohens Kappa
5b	nicht auswertbar	Cohens Kappa

Tabelle 16: Intraindividuelle Varianz der Ergebnisse zum Fremdmaterial in der BAL durch die Labore 1-5 (in Klammern Angabe des 95%-Konfidenzintervalls), dick gedruckte Werte zeigen eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse an.

Labore	BAL	statistisches Maß
1	-0,111 (-0,285-0,063)	gewichtetes Kappa
2	0,545 (0,062-0,99)	gewichtetes Kappa
3	0,659 (0,226-1,09)	gewichtetes Kappa
4	keine Angaben	gewichtetes Kappa
5a	nicht auswertbar	gewichtetes Kappa
5b	0,336 (-0,135-0,808)	gewichtetes Kappa

Tabelle 17: Intraindividuelle Varianz der Ergebnisse zu den eosinophilen Granulozyten im TBS durch die Labore 1-5 (in Klammern Angabe des 95%-Konfidenzintervalls).

Labore	TBS	statistisches Maß
1	nicht auswertbar	gewichtetes Kappa
2	keine Angaben	
3	keine Angaben	
4	-0,071 (-0,17-0,027)	gewichtetes Kappa
5a	0,417 (-0,252-1,085)	gewichtetes Kappa
5b	0,46 (-0,005-0,925)	gewichtetes Kappa

Tabelle 18: Intraindividuelle Varianz der Ergebnisse zu den doppel- und mehrkernigen Zellen im TBS durch die Labore 1-5 (in Klammern Angabe des 95%-Konfidenzintervalls).

Labore	TBS	statistisches Maß
1	0,062 (-0,376-0,501)	gewichtetes Kappa
2	0,129 (-0,244-0,502)	gewichtetes Kappa
3	0,231 (-0,302-0,764)	gewichtetes Kappa
4	keine Angaben	
5a	0,222 (-0,217-0,03)	gewichtetes Kappa
5b	0,074 (-0,307-0,455)	gewichtetes Kappa

Tabelle 19: Intraindividuelle Varianz der Ergebnisse zu den Epithelzellen im TBS durch die Labore 1-5 (in Klammern Angabe des 95%-Konfidenzintervalls).

Labore	TBS	statistisches Maß
1	0,28 (-0,115-0,676)	gewichtetes Kappa
2	0,268 (-0,121-0,657)	gewichtetes Kappa
3	0,39 (0,048-0,731)	gewichtetes Kappa
4	0,449 (-0,64-0,815)	ICC
5a	0,051 (-0,334-0,436)	gewichtetes Kappa
5b	nicht auswertbar	gewichtetes Kappa

Tabelle 20: Intraindividuelle Varianz der Ergebnisse zu den Bakterien im TBS durch die Labore 1-5.

Labore	TBS	statistisches Maß
1	nicht auswertbar	Cohens Kappa
2	-0,111	Cohens Kappa
3	0,25	Cohens Kappa
4	nicht auswertbar	Cohens Kappa
5a	0,451	Cohens Kappa
5b	0,294	Cohens Kappa

Tabelle 21: Intraindividuelle Varianz der Ergebnisse zum Fremdmaterial im TBS durch die Labore 1-5 (in Klammern Angabe des 95%-Konfidenzintervalls).

Labore	TBS	statistisches Maß
1	0,483 (0,111-0,854)	gewichtetes Kappa
2	0,071 (-0,429-0,571)	gewichtetes Kappa
3	-0,098 (-0,236-0,041)	gewichtetes Kappa
4	keine Angaben	
5a	nicht auswertbar	gewichtetes Kappa
5b	-0,119 (-0,319-0,081)	gewichtetes Kappa

Tabelle 22: Intraindividuelle Varianz der Ergebnisse zur Zellzahl im TBS durch die Labore 1-5 (in Klammern Angabe des 95%-Konfidenzintervalls).

Labore	TBS	statistisches Maß
1	0,531 (0,223-0,831)	gewichtetes Kappa
2	0,364 (-0,054-0,781)	gewichtetes Kappa
3	Nicht auswertbar	gewichtetes Kappa
4	0,268 (-0,196-0,733)	gewichtetes Kappa
5a	0,429 (-0,025-0,882)	gewichtetes Kappa
5b	0,155 (-0,206-0,516)	gewichtetes Kappa

Tabelle 23: Intraindividuelle Varianz der Ergebnisse zum Mukus im TBS durch die Labore 1-5 (in Klammern Angabe des 95%-Konfidenzintervalls).

Labore	TBS	statistisches Maß
1	0,038 (-0,324-0,4)	gewichtetes Kappa
2	0,129 (-0,291-0,549)	gewichtetes Kappa
3	0,282 (-0,093-0,657)	gewichtetes Kappa
4	0,225 (-0,18-0,63)	gewichtetes Kappa
5a	0,481 (0,107-0,856)	gewichtetes Kappa
5b	-0,103 (-0,441-0,235)	gewichtetes Kappa

Tabelle 24: Intraindividuelle Varianz der Ergebnisse zu Curschmannspiralen im TBS durch die Labore 1-5 (in Klammern Angabe des 95%-Konfidenzintervalls).

Labore	TBS	statistisches Maß
1	0,132 (-0,359-0,623)	gewichtetes Kappa
2	0,395 (0,09-0,701)	gewichtetes Kappa
3	0,359 (-0,228-0,946)	gewichtetes Kappa
4	Keine Angaben	gewichtetes Kappa
5a	-0,094 (-0,217-0,03)	gewichtetes Kappa
5b	0,348 (0,025-0,671)	gewichtetes Kappa

Tabelle 25: Interindividuelle Varianz TBS und BAL.

	Krippendorff's alpha (TBS)	95%-Konfidenz- intervall	Krippendorff's alpha (TBS)	95%- Konfidenz- intervall
Zelldichte	0,241	0,117-0,326	0,085	-0,05-0,194
Lymphozyten	0	-0,119-0,109	0,057	-0,046-0,161
Mehrkernige Zellen	-0,07	-0,184-0,045	-0,075	-0,193-0,042
Mukus	-0,008	-0,143-0,149	0,27	0,171-0,352
Curschmannspiralen	0,011	-0,133-0,144	-0,018	-0,224-0,175
Fremdmaterial	-0,068	-0,18-0,05	0,0177	-0,133-0,169
Epithelzellen	0,038	-0,091-0,145	-0,097	-0,208-0,008

Anhang

Pferd	1a	1b	2a	2b	3a	3b	4a	4b	5a	5b		
TBS	Zelldichte	ggr.	ggr.	ggr.	ggr.-mgr.	ggr.-mgr.	mgr.	ggr.-mgr.	ggr.-mgr.	ggr.-mgr	ggr.-mgr.	
	Makrophagen	einige, teilweise schaumig	einige, teilweise schaumig	etliche, viele schaumig, z.T. Phagozytose von	einige, teilweise schaumig, vereinzelt-wenig Phagozytose	einige, teilweise schaumig, vereinzelt Phagozytose von	einige-etliche, teils schaumig	einige	einige, teils schaumig, ganz vereinzelt	einige, teils schaumig	einige, teils schaumig	
	doppel-/mehrkernige Zellen	keine Angabe	keine Angabe	vereinzelt	vereinzelt	vereinzelt	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	ganz vereinzelt	
	neutrophile Granulozyten	keine Angabe	keine Angabe	wenige	vereinzelt	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	
	Lymphozyten	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	vereinzelt	keine Angabe	keine Angabe	vereinzelt	vereinzelt	vereinzelt	vereinzelt	
	eosinophile Granulozyten	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	
	Mucus	ggr.-mgr.	keine Angabe	mgr.	mgr.	mgr.,	mgr.	ggr.	ggr.	ggr.	mgr.	
	Fremdmaterial	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	vereinzelt Pollen und Pilzhypen	vereinzelt Pollen	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	vereinzelt Pilzhypen
	Curschmannspiralen	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	einige
	Bakterien	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe
Epithelzellen	einige	einige, ganz vereinzelt Plattenepithel	vereinzelt	keine Angabe	einige	einige	einige	einige	einige	einige	einige-etliche	
BAL	Zelldichte	ggr.-mgr.	ggr.-mgr.	mgr.	mgr.	mgr.	ggr.-mgr.	ggr.	ggr.-mgr.	ggr.-mgr.	ggr.-mgr.	
	Makros	einige, teilweise schaumig	einige-etliche, teilweise schaumig	einige-etliche, teilweise schaumig	etliche, teilweise schaumig	etlich, teilweise schaumig	etliche, teilweise schaumig	einige	einige-etliche, teils schaumig	einige-etliche, teils schaumig	einige-etliche, viele schaumig	
	mehr-/doppelkernige Zellen	keine Angabe	vereinzelt	vereinzelt-wenige	vereinzelt	vereinzelt	einige	keine Angabe	vereinzelt	keine Angabe	keine Angabe	
	neutrophile Granulozyten	keine Angabe	keine Angabe	vereinzelt	vereinzelt	keine Angabe	einige	ganz vereinzelt	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	
	Lymphos	einige-etliche	einige	einige	einige-etliche	etliche	einige	einige	einige	einige	vereinzelt	
	Mastzellen	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	
	eosinophile Granulozyten	vereinzelt	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	
	Mucus	mgr.	keine Angabe	mgr	keine Angabe	mgr.	mgr	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	
	Fremdmaterial	vereinzelt phagozytiert	vereinzelt phagozytiert	vereinzelt Pilzhypen	vereinzelt phagozytiert	vereinzelt phagozytiert	vereinzelt extrazelluläre Pollen	keine Angabe	vereinzelt phagozytiert	keine Angabe	keine Angabe	
	Curschmannspiralen	keine Angabe	keine Angabe	wenige	keine Angabe	keine Angabe	wenig	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	
Bakterien	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe		
Epithelzellen	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	vereinzelt	einige	ganz vereinzelt	vereinzelt	keine Angabe	keine Angabe		
Verdachtsdiagnose	evtl. mildes-moderates equines Asthma, Störung im RT	evtl. mildes-moderates equines Asthma, Störung im RT	Störung im RT	evtl. mildes-moderates equines Asthma, Störung im RT	evtl. mildes-moderates equines Asthma, Störung im RT	evtl. mildes-moderates equines Asthma, Störung im RT	Störung im RT	gesund	Störung im RT	Störung im RT	Störung im RT	

Tabelle 26: Befundergebnisse Labor 1 gesunde Pferde, RT: Respirationstrakt.

Anhang

Pferd	6a	6b	7a	7b	8a	8b	9a	9b	11a	11b	
TBS	Zelldichte	mgr.	ggr.	ggr.	ggr-mgr.	ggr-mgr.	mgr.	mgr.	mgr.-hgr.	hgr.	
	Makrophagen	einige, teils schaumiges Zytoplasma	einige, überwiegend schaumig	wenige, teils schaumig	einige, teils schaumig,	einige-etliche, teils schaumig	keine Angabe	einige, teils schaumig	einige	einige, teils schaumig	einige
	doppel-/mehrkernige Zellen	vereinzelt	vereinzelt	keine Angabe	vereinzelt	vereinzelt	keine Angabe	wenig	vereinzelt	keine Angabe	keine Angabe
	neutrophile Granulozyten	fokal einige nicht degenerierte	vereinzelt	einige	wenige-einige	einige-etliche	vereinzelt	einige, teils lytisch	wenige, nicht degeneriert	etliche	etliche
	Lymphozyten	ganz vereinzelt	keine Angabe	keine Angabe	vereinzelt	einige	keine Angabe	wenige	einige	keine Angabe	einige
	eosinophile Granulozyten	fokal einige	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe
	Mucus	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	mgr.	keine Angabe	viel	keine Angabe	ggr.	mgr.
	Fremdmaterial	keine Angabe	vereinzelt Pollen	vereinzelt Pollen	vereinzelt Pollen	vereinzelt Pflanzenpollen	vereinzelt Pflanzenpollen	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe
	Curschmannspiralen	keine Angabe	vereinzelt	wenige	keine Angabe	einige	keine Angabe	ganz vereinzelt	keine Angabe	keine Angabe	vereinzelt
	Bakterien	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe
Epithelzellen	einige Flimmerepithelien	vereinzelt	einige	einige	vereinzelt	einige	vereinzelt	häufig, ganz vereinzelt Becherzellen	vereinzelt	vereinzelt	
BAL	Zelldichte	hgr.	ggr.	mgr.	mgr.	mgr.	ggr.-mgr.	mgr.	mgr.	mgr.-hgr.	
	Makros	zahlreich, vereinzelt Hämosiderin	einige	einige, teils schaumig	zahlreich, teils schaumig	einige-etliche, teils schaumig	zahlreich, teils schaumig	einige, teils schaumig	einige	einige, teils schaumig	einige
	mehr-/doppelkernige Zellen	vereinzelt	vereinzelt	vereinzelt	vereinzelt	vereinzelt	vereinzelt	wenig	vereinzelt	vereinzelt	keine Angabe
	neutrophile Granulozyten	keine Angabe	keine Angabe	einige	einige	einige	keine Angabe	einige, teils lytisch	wenige, nicht degeneriert	einige-etliche	etliche-zahlreiche
	Lymphos	zahlreich	vereinzelt	wenige-einige	zahlreich	zahlreiche	keine Angabe	wenige	einige	einige-etliche	einige
	Mastzellen	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	vereinzelt	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe
	eosinophile Granulozyten	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	vereinzelt	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe
	Mucus	keine Angabe	keine Angabe	mgr.	keine Angabe	mgr.	mgr.	hgr.	keine Angabe	ggr.	mgr.
	Fremdmaterial	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	vereinzelt Pollen	keine Angabe	vereinzelt Pilzhypphen	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe
	Curschmannspiralen	keine Angabe	vereinzelt	vereinzelt	keine Angabe	einige	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	vereinzelt
Bakterien	vereinzelt an Plattenepithel	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	
Epithelzellen	vereinzelt, vereinzelt Becherzellen	einige	einige	keine Angabe	vereinzelt	vereinzelt	vereinzelt	häufig, ganz vereinzelt Becherzellen	vereinzelt	vereinzelt	
Verdachtsdiagnose	BAL: kein Hinweis auf equines Asthma, TBS: Verdachts auf equines Asthma	kein purulenter Entzündungsprozess, keine Diagnose	equines Asthma	mildes-moderates equines Asthma	equines Asthma: IAD/RAO	kein Hinweis auf purulente Prozesse	equines Asthma	equines Asthma	equines Asthma	equines Asthma	COB (IAD/RAO, equines Asthma)

Tabelle 27: Befundergebnisse Labor 1 Pferde mit MEA.

Anhang

Pferd		10a	10b	12a	12b	13a	13b	14a	14b	15a	15b
TBS	Zellichte	hgr.	hgr.	hoch	mgr.-hgr.	hgr.	mgr.	hgr.	hgr.	mgr.-hgr.	mgr.
	Makrophagen	einige, vereinzelt schaumig	einige	einige	einige, teils schaumige Vacuolen	einige, teils schaumig	einige	einige	wenige-einige, teils schaumig	einige	einige
	doppel-/mehrkernige Zellen	ganz vereinzelt	keine Angabe	vereinzelt	keine Angabe	vereinzelt	vereinzelt	keine Angabe	vereinzelt	keine Angabe	keine Angabe
	neutrophile Granulozyten	reichlich-massenhaft teils pyknotische	reichlich-massenhaft	etliche	etliche	wenige, teils lytische	einige, nicht degeneriert	etliche (ca. 70%)	zahlreiche, teilweise lytisch	etliche	etliche-zahlreiche
	Lymphozyten	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	einige	keine Angabe	wenige	vereinzelt-wenige	vereinzelt	keine Angabe
	eosinophile Granulozyten	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	ganz vereinzelt	keine Angabe	keine Angabe
	Mukus	mgr.	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	hgr.	keine Angabe	keine Angabe	hgr.	ggr.	mgr.
	Fremdmaterial	vereinzelt Pflanzenpollen	vereinzelt Pflanzensporen	keine Angabe	vereinzelt Pflanzenpollen	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	wenig Pollen	keine Angabe	keine Angabe
	Curschmannspiralen	einige	keine Angabe	einige	einige	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	vereinzelt	vereinzelt
	Bakterien	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	ganz vereinzelt Plattenepithel mit anhaftenden Bakterien
Epithelzellen	vereinzelt	einige	vereinzelt hochprismatisch	vereinzelt hochprismatisch	vereinzelt	vereinzelt	einige	vereinzelt	vereinzelt-wenig	vereinzelt-wenig	
BAL	Zellichte	mgr.	mgr.	mgr.	mgr.	hgr.	mgr.	hgr.	hgr.	ggr.-mgr.	ggr.-mgr.
	Makros	einige-etliche	einige-etliche, vereinzelt schaumig, vereinzelt mit	einige	einige, teils schaumig	einige, teils schaumig	zahlreich	einige, überwiegend schaumige	wenige-einige, teils schaumig	einige, teils schaumig	wenige-einige
	mehr-/doppelkernige Zellen	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	vereinzelt	vereinzelt	vereinzelt	vereinzelt	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe
	neutrophile Granulozyten	einige-etliche	wenige-einige	etliche	einige-etliche	wenige, teils lytisch	wenige, nicht degeneriert	überwiegend, nicht degeneriert (ca. 30%)	wenige-einige	einige	einige-etliche
	Lymphos	vereinzelt	einige-etliche	keine Angabe	vereinzelt	einige	einige	einige	einige	vereinzelt	einige
	Mastzellen	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	wenige	wenige	keine Angabe	einzelne	keine Angabe	keine Angabe
	eosinophile Granulozyten	keine Angabe	keine Angabe	vereinzelt	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe
	Mukus	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	mgr.	hgr.	keine Angabe	hgr.	hgr.	keine Angabe	ggr.
	Fremdmaterial	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe
	Curschmannspiralen	vereinzelt-einige	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe
	Bakterien	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe
Epithelzellen	einige-etliche	einige	vereinzelt hochprismatisch	vereinzelt hochprismatisch	vereinzelt Flimmerepithel	wenige, vereinzelt Becherzellen	vereinzelt Becherzellen	einzelne	einige	vereinzelt	
Verdachtsdiagnose	COB (equines Asthma)	chronisch immunologische Situation	equines Asthma	equines Asthma	equines Asthma	equines Asthma	COB (IAD/RAO, equines Asthma)	COB (equines Asthma, IAD/RAO)	mildes-moderates equines Asthma	COB (IAD/RAO)-equines Asthma	

Tabelle 28: Befundergebnisse Labor 1 Pferde mit SEA.

Anhang

Pferd		1a	1b	2a	2b	3a	3b	4a	4b	5a	5b	
TBS	Zelldichte	ggr.-mgr. dominieren, paaozytotisch aktiv	ggr.	ggr.	mgr	ggr.	hgr.	mgr.	hgr.	hgr.	mgr.	
	Makrophagen		dominieren	dominieren	dominieren	geringe Menge	keine Angabe	mgr.	dominieren	dominieren	ggr.	
	doppel- /mehrkernige Zellen	geringe Zahl	geringe Zahl	keine Angabe	geringe Zahl	vereinzelt	keine Angabe	geringe Zahl	geringer Zahl	keine Angabe	keine Angabe	
	neutrophile Granulozyten	ggr.	ggr.	ggr.	ggr.-mgr.	geringe Menge	keine Angabe	kaum	sehr vereinzelt	ganz vereinzelt	nicht/kaum	
	Lymphozyten	geringe Menge	geringe Menge	vereinzelt	mäßig	keine Angabe	keine Angabe	vereinzelt	ggr.-mgr.	ggr.	vereinzelt	
	Mucus	ggr.	mgr.	mgr.	ggr.	mgr.	keine Angabe	mgr.	mgr.	mgr.	mgr.	
	Curschmann- spiralen	keine Angabe	keine Angabe	ggr.	einzelne	keine Angabe	keine Angabe	ggr.	keine Angabe	einzelne	keine Angabe	
	Fremdmaterial	ggr	wenige Pilzhypen, ggr. Fremdmaterial	keine Angabe	ggr.	wenig	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	zahlreich	ggr.	keine Angabe
	Bakterien	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine	anhaltend an Plattenepithel	keine	keine	keine
	Epithelzellen	geringe Menge	wenig	ggr.	ggr.	dominieren	hgr.	mgr.	geringe Menge	ggr.	mgr.	
BAL	Zelldichte	ggr.-mgr.	mgr.-hgr.	hgr.	mgr	hgr.	hgr.	mgr.	hgr.	hgr.	mgr.	
	Makrophagen	dominieren	dominieren	60%	dominieren	dominieren, phagozytotisch aktiv	dominieren	mgr.	dominieren	dominieren	ggr.	
	doppel- /mehrkernige Zellen	geringe Menge	geringe Zahl	keine Angabe	geringer Menge	geringe-mittlere Zahl	geringe Zahl	geringer Zahl	geringe Zahl	vereinzelt	keine Angabe	
	neutrophile Granulozyten	ggr.	ggr.	10%	ggr.-mgr.	ggr.	ggr.	kaum	sehr vereinzelt	ganz vereinzelt	keine /kaum	
	Lymphozyten	geringe Menge	geringe Menge	30%	mgr.	geringer-mittlerer Zahl	keine Angabe	vereinzelt	ggr.-mgr.	ggr.	vereinzelt	
	Mastzellen	keine Angabe	keine Angabe	0%	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	
	eosinophile Granulozyten	vereinzelt	geringer Zahl	0%	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	vereinzelt	keine Angabe	keine Angabe	
	Mucus	ggr.	mgr.	ggr.	ggr.	mgr.	mgr.	mgr.	mgr.	ggr.	mgr.	
	Curschmann- spiralen	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	einzelne	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	
	Fremdmaterial	ggr.	ggr., wenig Pilzhypen	keine Angabe	keine Angabe	ggr.	ggr.	keine Angabe	zahlreich	keine Angabe	keine Angabe	
Bakterien	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine		
Epithelzellen	geringer Menge	wenige	ggr.	wenig	ggr.	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe		
Verdachtsdiagnose		IAD (mild)	IAD (mild)	unspezifisch, milde Hyper- und Dyskrie	equines Asthma möglich	evtl. mildes equines Asthma, TBS unauffällig	IAD	untypisch für equines Asthma, evtl. milde Form	kein Hinweis auf Lungenerkrankung	Normalbefund, ggr. Hyper und Dyskrie	Normalbefund	

Tabelle 29: Befundergebnisse Labor 2 gesunde Pferde.

Anhang

Pferd		6a	6b	7a	7b	8a	8b	9a	9b	11a	11b	
TBS	Zelldichte	mgr.	mgr.	hgr.	mgr.	mgr.	mgr.	hgr.	hgr.	hgr.	hgr.	
	Makrophagen doppel-/mehrkernige Zellen	dominieren	dominieren	dominieren	mgr.	mgr.	dominieren	mgr.	mgr.	ggr.	ggr.	
	neutrophile Granulozyten	geringe Menge	ggr.-mgr.	mgr.	keine Angabe	keine Angabe	mittlere Zahl	hgr.	ggr.	vereinzelt	vereinzelt	
	Lymphozyten	geringe Zahl	geringe Zahl	dominieren	vereinzelt	ggr.	mgr.	dominieren	dominieren	hgr.	hgr.	
	Mukus Curschmannspiralen	geringe Zahl	geringe Menge	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	mgr.	vereinzelt	keine Angabe	keine	keine	
		ggr.-mgr.	ggr.	mgr.	ggr.	ggr.	mgr.	hgr.	hgr.	mgr.	mgr.-hgr.	
		ggr.	ggr.	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	ggr.	mgr.	ggr.	vereinzelt	ggr.-mgr.	
	Fremdmaterial	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	wenig	wenig	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	ggr.	ggr.
	Bakterien	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine	extrazellulär	keine	extrazellulär	keine
Epithelzellen	ggr.	wenige	ggr.	ggr.	hgr.	ggr.	hgr.	hgr.	mgr.	einzel	einzel	
BAL	Zelldichte	mgr.	mgr.	hgr.	mgr.	mgr.	hgr.	hgr.	hgr.	hgr.	hgr.	
	Makrophagen doppel-/mehrkernige	dominieren	dominieren	dominieren	mgr.	mgr.	dominieren	mgr.	mgr.	ggr.	ggr.	
	neutrophile Granulozyten	geringe Zahl	keine Angabe	mgr.	keine Angabe	kein Angabe	mgr.	hgr.	ggr.	vereinzelt	vereinzelt	
	Lymphozyten	geringe Zahl	geringe Menge	dominieren	vereinzelt	ggr.	mgr.	dominieren	dominieren	hgr.	hgr.	
	Mastzellen	geringe Zahl	geringe Menge	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	mgr.	vereinzelt	keine Angabe	ggr.	ggr.	
	eosinophile Granulozyten	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	
	Mukus	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	
	Curschmannspiralen	keine Angabe	vereinzelt	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	geringe Zahl	keine Angabe	keine Angabe	
		ggr.-mgr.	ggr.	mgr.	ggr.	ggr.	mgr.	hgr.	hgr.	mgr.	mgr.-hgr.	
		keine Angabe	ggr.	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	ggr.	mgr.	ggr.	vereinzelt	ggr.-mgr.	
Fremdmaterial	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	wenig	wenig	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	ggr.	ggr.	
Bakterien	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine	extrazellulär	keine	extrazellulär	keine	
Epithelzellen	ggr.	ggr.	ggr.	ggr.	hgr.	ggr.	hgr.	hgr.	mgr.	keine Angabe	keine Angabe	
Verdachtsdiagnose	evtl.mildes-moderates equines Asthma, Hyper-/Dyskrinie	keine Verdachtsdiagnose, kein schweres equines Asthma	schweres equines Asthma (RAO)	kein akuter Schub des equinen Asthmas, Störung im RT	mgr. Makrophagenproliferation, nicht typisch für equines Asthma	RAO	RAO	RAO	RAO	RAO	RAO	

Tabelle 30: Befundergebnisse Labor 2 Pferde mit MEA.

Anhang

Pferd		10a	10b	12a	12b	13a	13b	14a	14b	15a	15b
TBS	Zelldichte	hgr.	hgr.	hgr.	hgr.	hgr.	hgr.	hgr.	hgr.	mgr.	hgr.
	Makrophagen	mgr.	ggr.-mgr.	ggr.	dominieren	ggr.	mgr.,	ggr.	mgr.	ggr.	mgr.
	doppel-/mehrkernige Zellen	geringe Zahl	geringe Zahl	keine Angabe	keine Angabe	geringe Zahl	geringe Zahl	ganz vereinzelt	mgr.	vereinzelt	geringe Zahl
	neutrophile Granulozyten	dominieren	dominieren	hgr.	dominieren	dominieren	dominieren	hgr.	mgr.	dominieren	dominieren
	Lymphozyten	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	vereinzelt	vereinzelt	keine Angabe	multipl	keine Angabe	vereinzelt
	Mukus	mgr.	mgr.	mgr.	mgr.	hgr.	mgr.	mgr.-hgr.	mgr.	ggr.	hgr.
	Curschmannspiralen	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	mgr.	ggr.	keine Angabe wenig Pilzhypen, ggr.	keine Angabe	vereinzelt	ggr.
	Fremdmaterial	wenig Pilzhypen	keine Angabe	wenig Pilzhypen	wenig	keine Angabe	keine Angabe	Fremdmaterial	ggr.	keine Angabe	keine Angabe
	Bakterien	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine	extrazellulär	keine
	Epithelzellen	ggr.	ggr.	ggr.	mgr.	mgr.	ggr.	ggr.	ggr.	ggr.	ggr.
BAL	Zelldichte	hgr.	hgr.	mgr.	hgr.	hgr.	hgr.	mgr.	hgr.	mgr.	hgr.
	Makrophagen	dominieren	dominieren	mgr.	dominieren	ggr.	mgr.	mgr.	mgr.	mgr.	mgr.
	doppel-/mehrkernige	geringe Zahl	geringe Zahl	ggr.	keine Angabe	geringe Zahl	geringe Zahl	geringe Zahl	mgr.	geringe Zahl	geringer Zahl
	neutrophile Granulozyten	dominieren	mgr.	mgr.	dominierend	dominieren	dominieren	mgr.	mgr.	dominieren	dominieren
	Lymphozyten	geringer Zahl	vereinzelt	mgr.	keine Angabe	vereinzelt	vereinzelt	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	vereinzelt
	Mastzellen	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe
	eosinophile Granulozyten	keine Angabe	geringer Zahl	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	geringe Zahl	keine Angabe
	Mukus	mgr.	ggr.-mgr.	ggr.	mgr.	hgr.	mgr.	ggr.	mgr.	kaum	hgr.
	Curschmannspiralen	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	mgr.	ggr.	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	ggr.
	Fremdmaterial	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe
Bakterien	keine	extrazellulär ggr., Plattenepithel mit Bakterien	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine	extrazellulär	keine
Epithelzellen	ggr.		keine Angabe	mgr.	mgr.	ggr.	keine Angabe	ggr.	keine Angabe	ggr.	
Verdachtsdiagnose	RAO	RAO	schweres equines Asthma (RAO)	schweres equines Asthma (RAO)	RAO	RAO	RAO	RAO	RAO	RAO	RAO

Tabelle 31: Befundergebnisse Labor 2 Pferde mit SEA.

Anhang

Pferd	1a	1b	2a	2b	3a	3b	4a	4b	5a	5b	
TBS	Zelldichte	keine Angabe	keine Angabe	ggr.	keine Angabe	mgr.	keine Angabe	hoch	hoch	keine Angabe	keine Angabe
	Makrophagen (%)	92	77%	75	89%	74	90%	96%	95%	95	99%
	mehrkernige Zellen	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	wenige	wenige	wenig	keine Angabe	keine Angabe
	neutrophile Granulozyten (%)	5	16%	5	10% (vereinzelt)	21	10% (vereinzelt)	1	1	3	1%
	Lymphozyten (%)	3	7% (vereinzelt)	3	1%	5	keine	3	3	1	0%
	Mucus	mgr.	hgr.	mgr.	keine Angabe	ggr.	hgr.	hgr.	hgr.	hgr.	hgr.
	Curschmannspiralen	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe
	Fremdmaterial	keine Angabe	keine Angabe	einige	keine Angabe	vereinzelt	keine Angabe	gelegentlich intrazellulär	gelegentlich intrazellulär	wenig	keine Angabe
Bakterien	keine	keine	keine	keine	ggr extrazellulär, selten auch intrazellulär	keine	keine	keine	keine	teilweise extrazelluläre Bakterien	
Epithelzellen	ggr.-mgr. Zilientragende Epithelzellen	wenige Flimmerzellen	mgr. hochprismatische zilientragende Epithelzellen	keine Angabe	ggr.-mgr. Zilientragende Epithelzellen	zahlreiche Flimmerepithel-zellen	keine Angabe	geringe Zahl	viele Epithelien	zahlreiche Flimmerepithelien, zT Plattenepithel	
BAL	Zelldichte	mgr.-hgr.	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	mgr.-hgr	keine Angabe	hoch	sehr hoch	hoch	keine Angabe
	Makrophagen (%)	67%	54%	60%	73%	55%	57%	61%	55%	85%	71
	mehrkernige Zellen	keine Angabe	vereinzelt		vereinzelt	einige	wenige	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	vereinzelt
	neutrophile Granulozyten	7	6%	2	0	9	4% (vereinzelt)	1%	1%	1%	0%
	Lymphos (%)	26	40%	38	27%	36	39%	33%	39%	12%	26%
	Mastzellen (%)		0%	wenig	0%	keine	0%	5%	5%	2%	3%
	eosinophile Granulozyten	0	0%	keine	0%	keine	0%	0%	0%	0%	<1%
	Mucus	mgr.	keine Angabe	mgr.	keine Angabe	ggr.	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe
	Curschmannspiralen	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe
	Fremdmaterial	ggr. Pilzhyphen und Hefezellen, gelegentlich phagozytiert extrazelluläre Bakterien	häufig phagozytierte Pflanzenteile und Pollen	ggr. Pilzhyphen und Hefezellen	vereinzelt intrazellulär	vereinzelt intrazellulär	zT phagozytose Pollen und Pflanzenteile	keine Angabe	keine Angabe	gelegentlich intrazellulär	keine Angabe
Bakterien		keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine		keine	
Epithelzellen	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	wenig Flimmerepithelzellen, einige Becherzellen	keine Angabe	keine Angabe		ganz vereinzelt Flimmerepithelzellen	
Diagnose	ggr. chron. Makrophagenreiche Entzündung, kein equines Asthma aber Störung im RT	ggr. granulomatöse Entzündung (Makros mit phagozytierten Pflanzenteilen), kein equines Asthma, aber Störung im RT	ggr. makrophagenreiche Entzündung, kein equines Asthma aber Störung im RT	ggr. granulomatöse Entzündung, kein equines Asthma aber Störung im RT	ggr. Makrophagenreiche Entzündung, kein equines Asthma, aber Störung im RT	ggr. granulomatöse Entzündung (Makrophagen), kein equines Asthma aber Störung im RT	ggr. Equines Asthma im inaktiven Stadium (Mastzellen) -> MEA	ggr. Equines Asthma im inaktiven Stadium > mildes-moderates equines Asthma	unauffällig, evtl. subklinisches oder ggr. Equines Asthma möglich (Mastzellen)	gesund außer Klinik lässt auf Asthma schließen	

Tabelle 32: Befundergebnisse Labor 3 gesunde Pferde, RT: Respirationstrakt.

Anhang

Pferd	6a	6b	7a	7b	8a	8b	9a	9b	11a	11b	
TBS	Zelldichte	keine Angabe	mgr	hoch	mgr.	keine Angabe	keine Angabe	sehr hoch	sehr hoch	keine Angabe	keine Angabe
	Makrophagen (%)	95%	100	40%	40%, leicht vakuolisiert	46% (einige)	26	ca. 10-20%	ca. 30%	3%	2%
	mehrkernige Zellen	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe
	neutrophile Granulozyten (%)	5%	0%	60%	60%, nicht degeneriert	32% (einige)	71	ca. 80-90%, nicht oder leicht degeneriert	ca. 70%, leicht oder moderat degeneriert	96%	97%
	Lymphozyten (%)	keine	0	keine	keine	22%	3	keine	keine	1%	1%
	Mucus	hgr.	hgr.	hgr.	hgr.	hgr.	hgr.	hgr.	hgr.	hgr.	hgr.
	Curschmannspiralen	keine Angabe	zahlreich	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	zahlreich	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe
	Fremdmaterial	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	nachweis von pflanzlichen Partikeln	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe
	Bakterien	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine	selten intrazellulär	keine	keine
	Epithelzellen	einige- zahlreiche Flimmerepithelzellen	vereinzelte Flimmerepithelzellen	keine Angabe	keine Angabe	einige Flimmerepithelien	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	vereinzelte Flimmerepithelien	keine Angabe
BAL	Zelldichte	keine Angabe	mgr	hoch	hoch	keine Angabe	keine Angabe	sehr hoch	hoch	keine Angabe	keine Angabe
	Makrophagen (%)	26% (einige)	63%	49%	60%	47%	49	32%	29%	10%	7%
	mehrkernige Zellen	keine Angabe	keine Angabe	selten	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe
	neutrophile Granulozyten	2% (ganz vereinzelt)	1%, nicht degeneriert	35% (häufig)	28%	8%	46	36%	33%	82%	93%
	Lymphos (%)	72% (zahlreich)	36%	16% (weniger)	10%	22%	4	32%	38%	6%	0%
	Mastzellen (%)	0%	0	selten	2%	0%	1	0%	0%	2%	<1%
	eosinophile Granulozyten	0%	0	0%	0%	0%	keine	0%	0%	0%	0%
	Mucus	keine Angabe	mgr.	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	hgr. muzinöses Material	keine Angabe	keine Angabe	hgr.	hgr.
	Curschmannspiralen	keine Angabe	einige	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe
	Fremdmaterial	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe
Bakterien	keine Angabe	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine	Plattenepithel mit Bakterien	keine	
Epithelzellen	keine Angabe	geringe Anzahl	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	wenige Flimmerepithelien	wenige Flimmerepithelien	
Diagnose	evtl. virale Infektion (BAL); TBS unauffällig	moderates equines Asthma	equines Asthma-> je nach Klinik RAO oder IAD	equines Asthma-> je nach Klinik RAO oder IAD	evtl equines Asthma, BAL erscheint physiologisch	SEA	EA wahrscheinlich RAO	equines Asthma, wenn Mibi negativ, wahrscheinlich IAD	RAO	RAO	

Tabelle 33: Befundergebnisse Labor 3 Pferde mit MEA.

Anhang

Pferd		10a	10b	12a	12b	13a	13b	14a	14b	15a	15b	
TBS	Zelldichte	keine Angabe	keine Angabe	hoch	hoch	hoch	hoch	keine Angabe	hoch	keine Angabe	keine Angabe	
	Makrophagen (%)	4%	4%	50	50	ca. 20-30% (weniger)	ca. 20%	30	24	6% (vereinzelt)	4% (vereinzelt)	
	mehrkernige Zellen	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	
	neutrophile Granulozyten (%)	96%	95%	50	50	ca. 70-80%, hauptsächlich nicht degeneriert	ca. 80%, hauptsächlich nicht degeneriert	64	71	93% (zahlreich)	96%	
	Lymphozyten (%)	keine	1%	keine	keine	keine	keine	6	5	1%	keine	
	Mukus	hgr.	hgr.	hgr.	hgr.	hgr.	hgr.	ggr.	ggr.	hgr.	hgr.	
	Curschmannspiralen	keine Angabe	keine Angabe	zahlreich	zahlreich	einige	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe
	Fremdmaterial	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe
	Bakterien	keine	keine	vereinzelt intra- und extrazellulär	geringe Anzahl extrazellulär und intrazellulär	keine	keine	Plattenepithel mit Mischflora	keine	vereinzelt Plattenepithel mit einigen Kokken	vereinzelt intrazellulär	
Epithelzellen	keine Angabe	keine Angabe	ggr. Flimmerepithelzellen	geringe Anzahl Flimmerepithelzellen	keine Angabe	keine Angabe	mgr. respiratorisches Epithel	keine Angabe	einige Flimmerepithelien, vereinzelt	wenige Flimmerepithelien		
BAL	Zelldichte	keine Angabe	keine Angabe	mgr	mgr	hoch	sehr hoch	keine Angabe	sehr hoch	keine Angabe	keine Angabe	
	Makrophagen (%)	48%	52%	55%	83%	25%	41%	36	20-30%	14%	20%	
	mehrkernige Zellen	vereinzelt	wenig	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	
	neutrophile Granulozyten (%)	26%	26% (nicht degeneriert)	24%	11%	12%	26%	41	ca. 70-80% (leicht oder moderat)	76%	55%	
	Lymphos (%)	22% (einige)	17%	20%	6%	60%	33%	21	keine Angabe	10%	24%	
	Mastzellen (%)	4%	4%	1%	0%	3%	0%	2	keine Angabe	0%	0%	
	eosinophile Granulozyten (%)	0%	1%	0%	0%	0%	0%	keine Angabe	keine Angabe	0%	1%	
	Mukus	keine Angabe	keine Angabe	hgr.	mgr.	keine Angabe	keine Angabe	ggr.	hgr.	keine Angabe	hgr.	
	Curschmannspiralen	keine Angabe	keine Angabe	zahlreich	zahlreich	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe
	Fremdmaterial	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	häufig	keine Angabe	keine Angabe	
	Bakterien	keine	keine	geringe Anzahl extrazellulär und innerhalb der	keine	keine	keine Angabe	keine	keine	keine	keine	
Epithelzellen	keine Angabe	keine Angabe	geringe Anzahl Flimmerzellen	mgr. Anzahl an Flimmerepithelzellen	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	vereinzelt Becherzellen	einige Flimmerepithelzellen, wenige Becherzellen		
Diagnose	wahrscheinlich RAO	wahrscheinlich IAD	moderates equines Asthma	moderates equines Asthma	equines Asthma wahrscheinlich RAO	equines Asthma, wahrscheinlich IAD	RAO	RAO wahrscheinlicher	IAD oder RAO je nach Klinik	IAD oder RAO je nach Klinik		

Tabelle 34: Befundergebnisse Labor 3 Pferde mit SEA.

Anhang

Pferd		1a	1b	2a	2b	3a	3b	4a	4b	5a	5b
BAL oder TBS	Zelldichte	ggr.	mgr.	ggr.	ggr.	mgr.	mgr.	mgr.	mgr.	mgr.	mgr.
	Makrophagen (%)	75-77%	79-81%	36-38%	52-54%	64-66%	70-72%	70-72%	47-49%	72-74%	76-78%
	neutrophile Granulozyten (%)	4-6%	2-4%	44-46%	5-7%	5-7%	8-10%	9-11%	2-4%	5-7%	1-3%
	Lymphozyten (%)	11-13%	4-6%	6-8%	21-23%	10-12%	11-13%	3-5%	36-38%	11-13%	11-13%
	Mastzellen (%)	<0,2%	<0,2%	<0,2	<0,2	<0,2%	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
	eosinophile Granulozyten (%)	<0,2%	<0,2%	<0,2	<0,2	<0,2%	<0,2	<0,2	<0,2%	<0,2	<0,2
	Mucus	20-30%	20%	20-30%	20%	30%	30%	wenig	20%	10%	10%
	Bakterien	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe
Epithelzellen	6-8%	11-13%	10-12%	18-20%	17-19%	7-9%	11-13%	11-13%	8-10%	8-10%	
Verdachtsdiagnose		leichte IAD	IAD	wahrscheinlich bakterieller Infekt, evtl noch zusätzlich Fremd- und Reizgase verantwortlich	IAD	IAD	IAD	IAD	IAD	IAD	IAD

Tabelle 35: Befundergebnisse Labor 4 gesunde Pferde.

Anhang

Pferd		6a	6b	7a	7b	8a	8b	9a	9b	11a	11b
BAL oder TBS	Zelldichte	mgr.	mgr.	mgr.	mgr.	mgr.	mgr.	hgr.	mgr.	mgr.	hgr.
	Makrophagen (%)	68-70%	40-42%	67-69%	63-65%	60-62%	50-52%	3-5%	29-31%	7-9%	12-14%
	neutrophile Granulozyten (%)	5-7%	3-5%	18-20%	10-12%	3-5%	7-9%	87-89%	43-45%	87-89%	81-83%
	Lymphozyten (%)	7-9%	50-52%	4-6%	11-13%	16-18%	19-21%	5-7%	15-17%	0-2%	3-5%
	Mastzellen (%)	<0,2%	<0,2%	0%	<0,2%	<0,2%	<0,2%	kaum	<0,2	<0,2	<0,1%
	eosinophile Granulozyten (%)	<0,2%	<0,2%	0%	<0,2%	<0,2%	<0,2%	kaum	<0,2	<0,2	<0,1%
	Mucus	bis 40%	kaum	>20%	<10%	<10%	<10%	kaum	30%	5%	kaum
	Bakterien	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	in Leukozyten bakterienverdächtige Erregerstrukturen	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe
Epithelzellen	16-18%	3-5%	7-9%	12-14%	17-19%	20-22%	1-3%	9-11%	3-5%	0-2%	
Verdachtsdiagnose		IAD	IAD	IAD	IAD	MEA, evtl. bereits RAO	IAD	bakterielle Bronchitis	RAO mit sekundärem bakteriellen Infekt oder primäre Bronchitis	bakterielle Bronchitis, wahrscheinlich RAO im Hintergrund (erst nach abgeheiltem Infekt zu beurteilen)	bakterieller Infekt

Tabelle 36: Befundergebnisse Labor 4 Pferde mit MEA.

Anhang

Pferd		10a	10b	12a	12b	13a	13b	14a	14b	15a	15b	
Zelldichte		mgr.	mgr.	mgr.	mgr.	mgr.	mgr.	ggr.	mgr.	mgr.	mgr.	
BAL oder TBS	Makrophagen (%)	34-36%	39-41%	21-23%	62-64%	16-18%	3-5%	63-65%	47-49%	8-10%	17-19%	
	neutrophile Granulozyten (%)	57-59%	45-47%	55-57%	15-17%	65-67%	90-92%	10-12%	28-30%	82-84%	65-67%	
	Lymphozyten (%)	4-6%	5-7%	12-14%	11-13%	7-9%	1-3%	11-13%	8-10%	6-8%	5-7%	
	Mastzellen (%)	<0,2%	1%	<0,2 %	0%	<0,2	<0,2%	<0,2	<0,2	0,3-0,4%	<0,2%	
	eosinophile Granulozyten (%)	<0,2%	kaum	<0,2%	0%	<0,2	<0,2%	<0,2	<0,2	0%	<0,2%	
	Mukus	20%	30%	10%	<10%	10%	5%	20%	30%	5%	10-20%	
	Bakterien	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angae	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	in Makrophagen und Neutrophilen enthaltene Kokken	keine Angabe
	Epithelzellen	1-3%		8-10%	8-10%	8-10%	2-4%	12-14%	13-15%	0-2%	9-11%	
	Verdachtsdiagnose	bakterielle Bronchitis	wahrscheinlich IAD oder RAO mit sekundär bakteriellem Infekt	RAO wenn Klinik länger besteht, ansonsten infektiös verursachte Bronchitis	IAD, Verdacht auf bakterielle Sekundärinfektion	Verdacht RAO	bakterielle Bronchitis	equines Asthma	equines Asthma mit Sekundärinfektion	bakterielle Bronchitis	bakterielle Bronchitis	

Tabelle 37: Befundergebnisse Labor 4 Pferde mit SEA.

Anhang

Pferd		1a	1b	2a	2b	3a	3b	4a	4b	5a	5b
TBS	Zelldichte	ggr.	ggr.	ggr.	mgr.	ggr.-mgr.	ggr.-mgr.	ggr.	ggr.-mgr.	ggr.	ggr.-mgr.
	Makrophagen	ggr.	ggr.	ggr.	mgr.	mgr.	mgr.	ggr.	mgr.	ggr.	mgr.
	doppel-/mehrkernige	keine	keine	ggr.	ggr.	keine	keine	keine	ggr.	ggr.	keine
	neutrophile Granulozyten	keine	keine	ggr.	kaum	keine	kaum	keine	keine	keine	keine
	Lymphozyten	kaum	kaum	kaum	ggr.	ggr.	mgr.	kaum	kaum	kaum	keine
	eosinophile Granulozyten	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine
	Mukus	ggr.	ggr.	ggr.	ggr.	ggr.	ggr.	mgr.	ggr.	ggr.	ggr.
	Curschmannspiralen	keine	keine	ggr.	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine
	Bakterien	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine
	Fremdmaterial	keins	keins	keins	ggr.	keins	ggr.	keins	keins	keins	keins
Epithelzellen	keine	ggr. Epithelzellverbände	ggr.	keine	keine	ggr.	keine	ggr., mgr. Epithelzellverbände	keine	ggr.	
BAL	Zelldichte	ggr.-mgr	mgr.	mgr.	ggr. Erhöht	mgr.	mgr.	ggr.	ggr.	ggr.	ggr.
	Makrophagen (%)	31%	49,50%	35,30%	46,50%	43,50%	32,50%	40%	44%	63,80%	46,80%
	mehr-/doppelkernige Zellen	vereinzelt	vereinzelt	keine	keine	3,0%, vereinzelt Phagozytose	2,25%	keine	vereinzelt	keine	keine
	neutrophile Granulozyten (%)	keine	8,50%	keine	0,75%	1,50%	0,50%	keine	keine	1,00%	8%
	Lymphozyten (%)	69%	42%	64,80%	52,50%	52%	64,30%	60%	56%	35,30%	45,30%
	Mastzellen (%)	keine	keine	keine	0,25%	keine	0,50%	keine	keine	keine	keine
	eosinophile Granulozyten (%)	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine
	Mukus	ggr.	keine	keine	keine	ggr.	ggr.	mgr.	ggr.	ggr.	keine
	Curschmannspiralen	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine
	Bakterien	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine
Fremdmaterial	keins	keins	keins	keins	keins	keins	keins	keins	keins	keins	
Epithelzellen	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine	
Verdachtsdiagnose		leichte Hyperkrinie, sonst lungengesund	Lungengesund	weitgehend unauffällig, Zustand nach bakt. Infektion möglich	lungengesund	leichte Dyskrinie, sonst lungengesund	Hyper und Dyskrinie, remission equines Asthma nicht auszuschließen	Hyperkrinie, keine Lungenerkrankung	lungengesund	lungengesund	lungengesund

Tabelle 38: Befundergebnisse Labor 5 Untersucher A gesunde Pferde.

Anhang

Pferd		6a	6b	7a	7b	8a	8b	9a	9b
TBS	Zelldichte	mgr.	ggr.-mgr.	ggr.	ggr.-mgr.	mgr.	mgr.	mgr.	mgr.
	Makrophagen	ggr.	mgr.	mgr.	mgr.	mgr.	mgr.	mgr.	ggr.
	doppel-/mehrkernige Zellen	keine	keine	ggr.	ggr.	keine	keine	keine	keine
	neutrophile Granulozyten	keine	ggr.	ggr.	mgr.	hgr.	mgr.	hgr.	hgr.
	Lymphozyten	kaum	mgr.	kaum	kaum	ggr.	kaum	kaum	kaum
	eosinophile Granulozyten	keine	keine	keine	keine	keine	keine	kaum	keine
	Mucus	mgr.	mgr.	mgr.	ggr.	mgr.	mgr.	ggr.	ggr.
	Curschmannspiralen	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine
	Bakterien	keine	ggr. intrazellulär	keine	keine	ggr.intrazellulär	ggr.intrazellulär	keine	keine
	Fremdmaterial	keins	keins	keins	keins	keins	ggr.	keins	keins
Epithelzellen	mgr.	ggr.	ggr.	keine, ggr. Becherzellen	ggr.	ggr.	ggr. jugendliche Becherzellen	mgr. Becherzellen	
BAL	Zelldichte	ggr.	ggr.	mgr.	mgr.	ggr.	ggr.-mgr	mgr.	mgr.
	Makrophagen (%)	42,80%	31,80%	42%	28,30%	27,80%	28%	30,50%	22,70%
	mehr-/doppelkernige Zellen	keine	vereinzelt	keine	vereinzelt	keine	keine	keine	vereinzelt
	neutrophile Granulozyten (%)	1,50%	3,25%	13,80%	22%	7,25%	18,50%	12,50%	33,70%
	Lymphozyten (%)	55,80%	65%	44%	49,70%	65%	53,50%	57%	43,70%
	Mastzellen (%)	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine
	eosinophile Granulozyten (%)	keine	keine	0,25%	keine	keien	keine	keine	keien
	Mucus	ggr.	kaum	ggr.	ggr.	keine	ggr.	mgr.	mgr.-hgr.
	Curschmannspiralen	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine
	Bakterien	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine
Fremdmaterial	keins	keins	keins	keins	keins	keins	keins	keins	
Epithelzellen	sehr vereinzelt	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine	
Verdachtsdiagnose		gesund oder equines Asthma in Remission	gesund oder MEA in Remission	MEA oder SEA in Remission	MEA oder SEA in Remission	gesund (BAL) oder MEA (TBS)	MEA	MEA oder SEA in Remission	SEA mit ausgeprägter Dyskrie

Tabelle 39: Befundergebnisse Labor 5 Untersucher A Pferde mit MEA

Anhang

Pferd		10a	10b	12a	12b	13a	13b	14a	14b	15a	15b	
TBS	Zelldichte	mgr.	mgr.	ggr.-mgr.	ggr.-mgr.	ggr.-mgr.	mgr.	ggr.mgr.	mgr.	mgr.	mgr.-hgr.	
	Makrophagen	mgr.	ggr.	mgr.	ggr.	mgr.	ggr.	ggr.	mgr.	ggr.	ggr.	
	doppel-/mehrkernige Zellen	ggr	keine	ggr.	keine	keine	keine	keine	keine	ggr.	keine	
	neutrophile Granulozyten	hgr.	höchstgradig	mgr.	hgr.	mgr.	hgr.	mgr.	hgr.	hgr.	hgr.	
	Lymphozyten	keine	kaum	kaum-ggr.	kaum	kaum	keine	kaum	ggr.	kaum	kaum	
	eosinophile Granulozyten	kaum	kaum	keine	keine	keine	keine	keine	kaum	keine	keine	
	Mukus	ggr.	mgr.	ggr.	ggr.	mgr.	hgr.	mgr.	mgr.	ggr.	ggr.	
	Curschmannspiralen	keine	keine	keine	keine	keine	ggr.	vereinzelt	keine	keine	keine	
	Bakterien	keine	vereinzelt extrazellulär	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine
	Fremdmaterial	keins	keins	keins	keins	keins	ggr.	keins	keins	keins	keins	
Epithelzellen	keine	keine	ggr.	ggr.	ggr. Becherzellen	keine	keine	keine	keine	ggr. Epithelzellverbände	keine	
BAL	Zelldichte	mgr-hgr.	hgr	mgr.	mgr.	mgr.	mgr.	ggr.	ggr.	mgr.	mgr.	
	Makrophagen (%)	49%	42,30%	42,50%	42%	28,50%	22%	29%	22,70%	19%	20,50%	
	mehr-/doppelkernige Zellen	keine	vereinzelt	keine	keine	einzelne	keine	vereinzelt	vereinzelt	keine	vereinzelt	
	neutrophile Granulozyten (%)	20,50%	18,25%	27,80%	13%	6,25%	18%	13,30%	24%	60,80%	55,80%	
	Lymphozyten (%)	30%	39,30%	28,50%	43,30%	64,80%	60%	56,80%	53,30%	13,80%	20,80%	
	Mastzellen (%)	0,50%	0,25%	keine	keine	keine	keine	0,25%	keine	0,00%	3%	
	eosinophile Granulozyten (%)	keine	keine	1,25%	1,75%	keine	keine	keine	keine	6,50%	keine	
	Mukus	ggr.	mgr.	mgr.	ggr.	mgr.	mgr.	keine	keine	ggr.	ggr.	
	Curschmannspiralen											
	Bakterien	sehr vereinzelt, extrazellulär	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine
Fremdmaterial	keins	keins	keins	keins	keins	keins	vereinzelt	keins	vereinzelt Pollen	keins		
Epithelzellen	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine		
Verdachtsdiagnose		MEA	MEA	SEA	MEA oder SEA am Übergang zur Remission	EA in Remission	MEA oder SEA in Remission	MEA oder SEA in Remission	SEA	SEA + MEA eosinophile Subform	SEA	

Tabelle 40: Befundergebnisse Labor 5 Untersucher A Pferde mit SEA

Anhang

Pferd	1a	1b	2a	2b	3a	3b	4a	4b	5a	5b	
TBS	Zelldichte	ggr	ggr	ggr	ggr	mgr	ggr	ggr	ggr.	ggr	mgr
	Makrophagen	hgr	hgr	mgr	hgr	hgr	hgr	hgr	hgr	hgr	hgr
	doppel-/mehrkernige Zellen	ggr	nein	mgr	mgr	nein	ggr	ggr	ggr	ggr	keine
	neutrophile Granulozyten	vereinzelt	vereinzelt	mgr	ggr	ggr	keine	kaum	ggr	vereinzelt	ggr
	Lymphozyten	ggr	vereinzelt	ggr	ggr	keine	kaum	kaum	ggr	vereinzelt	ggr
	eosinophile Granulozyten	vereinzelt	keine	keine	vereinzelt	keine	keine	keine	vereinzelt	keine	keine
	Mucus	ggr	ggr	mgr	mgr	mgr	ggr	mgr	ggr	mgr	mgr
	Curschmannspiralen	keine	keine	vereinzelt	ggr	ggr	keine	keine	nein	vereinzelt	vereinzelt
	Bakterien	vereinzelt extrazellulär	ggr beides	keine	keine	extrazellulär	keine	keine	ggr. extrazellulär	keine	keine
	Fremdmaterial	ggr	viel	nein	ggr	ja	ja	vereinzelt	vereinzelt	vereinzelt	ggr
BAL	Epithelzellen	ggr	ggr	nein	ggr	ggr	mgr	ggr	ggr	ggr	ggr
	Zelldichte	mgr	ggr	mgr	mgr	mgr	mgr	ggr	ggr	ggr	ggr
	Makrophagen (%)	36,20	35,40	67	59	58,2	35	63%	62,4	68%	79,8
	mehr-/doppelkernige Zellen	ja	ja	ja	nein	wenig	viel	ja	ja	ja	vereinzelt
	neutrophile Granulozyten (%)	2,5	2,40	18	4	4,6	2,7	2%	2,6	2%	3,4
	Lymphozyten (%)	60,7	62%	31	37	37	62,30	35%	35	29,75	16,8
	Mastzellen (%)	0	0%	0	0	0	0%	0%	0	0%	0
	eosinophile Granulozyten (%)	0,6	0,20	0,2	0	0,2	0	0%	0	0,25	0
	Mucus	mgr	ggr	mgr	minimal	ggr	mgr	ggr	ggr	ggr	ggr
	Curschmannspiralen	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
Bakterien	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
Fremdmaterial	ggr	ggr	ja	ggr	ja	ja	nein	nein	nein	nein	
Epithelzellen	vereinzelt	nein	vereinzelt	nein	vereinzelt	vereinzelt	nein	nein	vereinzelt	vereinzelt	
Verdachtsdiagnose	lungengesund	lungengesund	lungengesund	lungengesund	MEA in Remission	lungengesund	lungengesund	lungengesund	lungengesund	lungengesund	lungengesund

Tabelle 41: Befundergebnisse Labor 5 Untersucher B gesunde Pferde.

Anhang

Pferd		6a	6b	7a	7b	8a	8b	9a	9b	11a	11b
TBS	Zelldichte	ggr	ggr	mgr	ggr	ggr	ggr	mgr	mgr	hgr	mgr
	Makrophagen	hgr	hgr	mgr	hgr	mgr	mgr	ggr	ggr	ggr	ggr
	doppel- /mehrkernige Zellen	ggr	ggr	ggr	ggr	ggr	ggr	ggr	ggr	ggr	keine
	neutrophile Granulozyten	ggr	ggr	hgr	mgr	mgr	hgr	hgr	hgr	höchstgradig	höchstgradig
	Lymphozyten	ggr	ggr	ggr	ggr	vereinzelt	ggr	vereinzelt	ggr	vereinzelt	vereinzelt
	eosinophile Granulozyten	keine	keine	keine	keine	keine	vereinzelt	keine	keine	keine	keine
	Mukus	ggr	mgr	mgr	mgr	ggr	mgr	hgr	mgr	hgr	mgr
	Curschmann- spiralen	vereinzelt	ggr	ggr	selten	keine	vereinzelt	ggr	mgr	vereinzelt	vereinzelt
	Bakterien	keine	keine	keine	keine	keine	keine	vereinzelt extrazellulär	keine	keine	keine
	Fremdmaterial	ggr	ja	ggr	nein	ggr	ggr	ggr	nein	ggr	vereinzelt
Epithelzellen	ggr	ggr	ggr	mgr	ggr	ggr	ggr	ggr	ggr	ggr	
BAL	Zelldichte	mgr	mgr	mgr	mgr	ggr	ggr	mgr	mgr	mgr	mgr
	Makrophagen (%)	78,5	79%	43	53,1	57,30	52,8	56,30	45,3	29,60	32,50
	mehr- /doppelkernige Zellen	ja	keine	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja
	neutrophile Granulozyten (%)	5,25	4,5	28,6	22,3	15,50	17,2	32%	22,8	69,40	65%
	Lymphozyten (%)	15,8	16,5	28	23,5	27,20	30	11,70	31,8	0%	3%
	Mastzellen (%)	0	0	0	0	0%	0	0%	0	0%	0
	eosinophile Granulozyten (%)	0,75	0	0%	0,1	0%	0	0%	0,25	0%	0,50
	Mukus	ggr	ggr	mgr	ggr	ggr	ggr	hgr	mgr	mgr	mgr
	Curschmannspiralen	keine	keine	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
	Bakterien	keine	keine	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
Fremdmaterial	keine	keine	vereinzelt	nein	vereinzelt	nein	ggr	ggr	nein	nein	
Epithelzellen	keine	vereinzelt	nein	ggr	vereinzelt	nein	nein	vereinzelt	vereinzelt	vereinzelt	
Verdachtsdiagnose	SEA in Remission	lungengesund	SEA	SEA in Remission	MEA	MEA	SEA	MEA	SEA	SEA	

Tabelle 42: Befundergebnisse Labor 5 Untersucher B Pferde mit MEA.

Anhang

Pferd		10a	10b	12a	12b	13a	13b	14a	14b	15a	15b
TBS	Zelldichte	mgr	mgr	mgr	ggr	mgr	ggr	ggr	mgr	mgr	hgr
	Makrophagen	ggr	ggr	mgr	ggr	ggr	mgr	mgr	mgr	mgr	mgr
	doppel-/mehrkernige Zellen	ggr	ggr	ggr	keine	ggr	ggr	ggr	ggr	ggr	ggr
	neutrophile Granulozyten	hgr	höchstgradig	hgr	hgr	hgr	hgr	hgr	hgr	hgr	hgr
	Lymphozyten	ggr	kaum	ggr	ggr	ggr	ggr	keine	ggr	kaum	vereinzelt
	eosinophile Granulozyten	vereinzelt	kaum	ggr	ggr	vereinzelt	keine	kaum	vereinzelt	kaum	vereinzelt
	Mukus	mgr	mgr	mgr	ggr	mgr	mgr	ggr	hgr	ggr	mgr
	Curschmannspiralen	ggr	ggr	ggr	ggr	ggr	mgr	ggr	mgr	vereinzelt	ggr
	Bakterien	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine	mgr extrazellulär	ggr. extrazellulär
	Fremdmaterial	ggr	keins	ggr	ggr	ggr	nein	ggr	mgr	vereinzelt	ggr
	Epithelzellen	ggr	ggr	ggr	ggr	keine	ggr	ggr	ggr	ggr	ggr
BAL	Zelldichte	hgr	hgr	ggr	ggr	mgr	ggr	ggr	ggr	mgr	mgr
	Makrophagen (%)	61	52,3	56,5	63,8	65%	68,8	48	45,5	30,3	29%
	mehr-/doppelkernige Zellen	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	nein	nein	nein
	neutrophile Granulozyten (%)	35%	24,7	25,5	20,6	27%	9,6	22	40,3	65,3	65,50
	Lymphozyten (%)	2,4	21,7	16,3	15,4	8%	21,6	26	14,3	3	5,40
	Mastzellen (%)	0%	0%	0	0	0%	0	0	0	0	0%
	eosinophile Granulozyten (%)	2%	1,30	1,8	0,2	0%	0	0	0	1,5	0,10
	Mukus	ggr	mgr	mgr	mgr	mgr	mgr	ggr	ggr	ggr	mgr
	Curschmannspiralen	nein	nein	keine	keine	nein	vereinzelt	nein	nein	nein	nein
	Bakterien	minimal extrazellulär	keine	keine	keine	nein	nein	nein	nein	nein	nein
	Fremdmaterial	nein	vereinzelt	vereinzelt	keine	nein	ggr	nein	nein	ggr	ggr
Epithelzellen	vereinzelt	keine	ggr	sehr vereinzelt	nein	vereinzelt	nein	vereinzelt	vereinzelt	vereinzelt	
Verdachtsdiagnose	SEA	MEA	SEA in Remission	MEA	SEA	MEA	MEA	SEA	SEA	SEA	

Tabelle 43: Befundergebnisse Labor 5 Untersucher B Pferde mit SEA.

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich der gesamten internistischen Abteilung der Klinik für Pferde der Freien Universität Berlin, die mich bei der Durchführung meiner Studie unterstützt hat, meinen großen Dank aussprechen.

Besonders danken möchte ich ebenfalls Prof. Dr. Heidrun Gehlen für die Unterstützung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit.

Außerdem möchte ich mich besonders bei meinen Eltern bedanken, die mir das Studium der Veterinärmedizin ermöglicht haben, mich auf meinem Weg immer unterstützt und während der gesamten Arbeit an der Dissertation immer wieder ermutigt haben.

12 Interessenskonflikte

Im Rahmen dieser Arbeit bestehen keine Interessenskonflikte durch Zuwendungen Dritter.

13 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, 24.4.2024

Julia Pöhlig



9 783967 292435

mbvberlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-243-5