

Die bronchoalveoläre Lavage beim Fohlen: Indikationen, Methode und Ergebnisse

Wiebke Block¹, Marc Lämmer¹ und Monica Venner²

Tierklinik Kaufunger Wald, Kaufungen¹ und Tierärztliche Klinik für Pferde, Destedt²

Zusammenfassung

Die bronchoalveoläre Lavage (BAL) ist eine Untersuchungsmethode, die beim erwachsenen Pferd zur Diagnostik von Erkrankungen der kleinen Atemwege und des Lungenparenchyms eingesetzt wird. Auch bei Fohlen wird die Durchführung der BAL zur Diagnostik und zum Erregernachweis, insbesondere von *Pneumocystis carinii*, genutzt. Weiterhin stellt die BAL bei der Ermittlung von Wirkstoffkonzentrationen im Lungengewebe und in den bronchoalveolären Zellen im Rahmen von pharmakokinetischen Studien die Methode der Wahl dar. Bei 34 gesunden Fohlen wurde in 168 durchgeführten BALs die Durchführung der bronchoalveolären Lavage beim Fohlen erprobt. Um eine Rückgewinnungsrate von mindestens 60% zu sichern, wird die BAL endoskopisch und in Allgemeinanästhesie durchgeführt. Es wurden zweifach bzw. viermal 100 ml PBS in einen Bronchus instilliert und manuell wieder abgesaugt. Die BAL-Flüssigkeit wurde zentrifugiert und das Differenzialzellbild quantitativ ermittelt. Die Zellzahl lag bei gesunden Fohlen ($n=25$) im Alter von 8 bis 12 Wochen bei $14 \pm 5,8$ G/L und die meist vertretenen Zellen in der Zellpopulation waren Makrophagen (73 ± 14 %), gefolgt von Lymphozyten (18 ± 12 %).

Schlüsselwörter: BAL / bronchoalveoläre Lavage / Fohlen / Pulmologie / Indikation/ Diagnostik / Labormedizin

Bronchoalveolar lavage in the foal: Indication, method and results

The bronchoalveolar lavage (BAL) is a procedure, which is used to differentiate and evaluate various lower airway diseases in adult horses. In foals this method is the best way to diagnose a *Pneumocystis carinii* infection in vivo. Bronchoalveolar lavages are also useful for pharmacokinetic studies to determine concentrations of agents in the tissue of the lung or in the bronchoalveolar cells. The method of performing BAL was evaluated in a total number of 34 foals and 168 BALs. To ensure a recovery rate of more than 60% BALF the bronchoalveolar lavage was performed endoscopically in general anaesthesia. The cell count was determined, the bronchoalveolar fluid was centrifuged and a slide was made to differentiate the cells. The total cell count was $14 \pm 5,8$ G/L and most numerous cell populations were macrophages (73 ± 14 %) and lymphocytes (18 ± 12 %) in healthy foals ($n=25$) in the age of 8 to 12 weeks.

Keywords: BAL / bronchoalveolar lavage / foal / pulmology / diagnostics / indication / laboratory medicine

Einleitung

Die bronchoalveoläre Lavage (BAL) gilt heute am sedierten, stehenden erwachsenen Pferd als risikoarmes diagnostisches Verfahren (Viel und Hewson 2003). Die BAL erlaubt die Gewinnung von Zellen und Flüssigkeit aus den kleinen Atemwegen und Alveolen und ermöglicht so Informationen über die pathologischen Abläufe und evtl. über das Erregerspektrum am Ort des entzündlichen Geschehens (Fey 2004) zu erhalten. Somit kann die BAL zur Diagnose insbesondere bei Erkrankungen des Lungenparenchyms verhelfen. Bei erwachsenen Pferden konnte nachgewiesen werden, dass eine gute Korrelation zwischen Befunden der BAL-Zytologie und der histopathologischen Untersuchung von Lungenbiopsien besteht (Rush und Mair 2004). Bei fokalen Lungenerkrankungen ist der Einsatz der BAL hingegen limitiert, da lediglich ein begrenztes Segment beprobt wird. Deshalb ist bei umschriebenen bakteriellen Lungenerkrankungen eine Untersuchung des Tracheobronchialsekretes (TBS) der BAL vorzuziehen. Das TBS stellt eine Poolprobe der gesamten Atemwege dar und liefert daher sowohl bei fokalen als auch bei generalisierten Lungenerkrankungen meistens repräsentative Ergebnisse. Im Falle einer bakteriell bedingten Erkrankung gilt eine BAL sogar als kontraindiziert, da sie möglicherweise zu einem tieferen Einbringen der Keime in die Lunge führen kann.

Die BAL wird am adulten, stehenden (Derksen et al. 1985), sedierten Pferd oder Pony unter endoskopischer Kontrolle (Viel 1980) oder blind mit einem flexiblen BAL-Katheter durchgeführt (Fogarty 1990).

Bei der transendoskopisch durchgeführten BAL wird das Endoskop in einen dorsal abgehenden Bronchus der zweiten oder dritten Generation vorgeschoben und eingeklemt. Dann wird die Spülflüssigkeit instilliert und nach einigen Sekunden wieder abgesaugt. In den Fällen bei denen ein Hustenreiz das weitere Vorschieben verhindert, wird Lokalanästhetikum (Lidocain 1% Lösung) über den Arbeitskanal lokal verabreicht.

Bei der blinden Methode wird eine circa 250 cm lange, flexible BAL-Sonde über den ventralen Nasengang in die Trachea eingeführt und vorsichtig weiterschoben, bis sie sich nicht mehr vorschieben lässt. Röntgenaufnahmen haben gezeigt, dass die Sonde dabei meistens in einem Bronchus der zweiten Generation eingeklemt ist. Nun wird der Ballon an der Spitze der Sonde durch die Insufflation von ca. 5 ml Luft aufgepumpt. Anschließend wird Spülflüssigkeit ohne großen Verlust über das Lumen der Sonde in die Atemwege eingegeben und abgesaugt. So lassen sich unter Praxisbedingungen diagnostisch verwertbare Proben gewinnen (Fogarty 1990, Wehrli-Eser et al. 2000).

Zur Diagnostik von Lungenerkrankungen beim Fohlen werden neben der klinischen Untersuchung, bildgebende Verfahren wie die Sonographie und die Röntgenuntersuchung eingesetzt. In einzelnen Fällen ist jedoch eine weiterführende Diagnostik, zum Beispiel zur Bestimmung des Erregers bei einer therapieresistenten oder rezidivierenden Bronchitis oder Pneumonie notwendig. So lassen sich bei hochgradiger Symptomatik häufig erst durch die Untersuchung von TBS und BALF Aussagen hinsichtlich Schweregrad, Prognose und Erreger bei einer Lungenerkrankung treffen (Bain 1997). Insbesondere gilt dies bei der Pneumocystis carinii-Pneumonie bei Fohlen, denn dieser mikroskopische Pilz lässt sich ausschließlich in der BALF oder in Lungenbiopsaten identifizieren (Hoffman et al. 1991). Beim Fohlen lässt sich die BAL am sichersten unter Allgemeinanästhesie durchführen und wird im Folgenden beschrieben.

Material und Methode

Durchführung der BAL

In drei Studien an Fohlen (Höhensteiger 2005, Schock 2008, Block 2010) wurde eine BAL-Methode etabliert, die geeignet ist bei Fohlen reproduzierbare Rückgewinnungsraten zu erzielen. Diese BALs erfolgten im Rahmen von pharmakokinetischen Studien, die genehmigte Tierversuche waren (Aktz.: LVL M-V/TSD/7221.3-2.1-021/04, LALLF M-V/TSD/ 7221.3-2.1-010/06, LALLF M-V/TSD/7221.3-1.1-066/08). Im Folgenden wird von einer BAL-Methode berichtet, die mehrmals an 34 Warmblutfohlen durchgeführt wurde. Dies ergab insgesamt 168 auswertbare BALs. Das Alter der Fohlen betrug 60 ± 9 Tage, das jüngste Fohlen war 41, das älteste 80 Tage alt. Das Gewicht der Fohlen betrug 120 bis 170 kg.

Im Gegensatz zum erwachsenen Pferd, bei dem eine Sedation genügt, erfolgten die BALs bei den Fohlen in Allgemeinanästhesie. Die Dauer der Kurznarkose betrug ca. 15 Minuten. Nach einer präanästhetischen Untersuchung wurde den Fohlen vor der Durchführung der BAL ein Verweilkatheter in eine V. jugularis externa gelegt und dieser fixiert. Dann wurden die Fohlen mit Xylazinhydrochlorid (0,8 mg/kg i.v.) sediert und circa fünf Minuten später wurde, bei ausreichend sedierten Zustand, mit Ketamin (2,2 mg/kg i.v.) und Diazepam (0,2 mg/kg i.v.) die Narkose induziert. Die Fohlen wurden in Seitenlage auf eine weiche, kunststoffüberzogene Schaumstoffmatte gelegt und es wurde bei kalten Außentemperaturen darauf geachtet, dass die Fohlen während der Narkose nicht auskühlten. Nachdem das Toleranzstadium erreicht war, wurden die Fohlen so in Brustlage gelegt, dass sich die zu spülende Lungenseite oben befand. Eine Person wurde sitzend, auf Höhe der Schulter positioniert und fixierte Kopf und Hals des Fohlens leicht gestreckt auf ihren Beinen.

Die Durchführung der BAL erfolgte endoskopisch. Verwendet wurde ein zuvor desinfiziertes Endoskop mit einem Durchmesser von 8,4 mm und einer Länge von 140 cm. Die Nüstern der Fohlen wurden trocken gereinigt, um den Eintrag von Schmutz in die tieferen Atemwege zu verringern. Das Endoskop wurde nun in den ventralen Nasengang eingeführt und über die Trachea bis zur Bifurcatio tracheae vorgeschoben. Hier wurde der Hauptbronchus der oberliegenden Lungenseite ausgewählt und das Endoskop vorsichtig weiter vor-

geschoben. Begannen die Fohlen zu schlucken oder zu husten, wurde Ketamin und Diazepam verabreicht, um eine Verletzung der Atemwege durch das Endoskop zu vermeiden. Das Endoskop wurde soweit vorgeschoben, bis es in einen nach dorsal gerichtetem Bronchus der zweiten Generation eingeklemt war. In dieser Position wurde es mit ganz leichtem Druck gehalten. Die Spülung des abgedichteten Bronchus erfolgte mit 2 bzw. 4x100 ml vorgewärmter (37°C) PBS Lösung, die in vier Fraktionen aufgeteilt war. Die Flüssigkeit wurde manuell mit einem mäßigen Druck instilliert. Nachdem 100 ml der PBS Lösung appliziert wurden, erfolgte eine Pause von 5 Sekunden. Anschließend wurde die Flüssigkeit manuell aspiriert. Dabei wurde darauf geachtet, dass der Unterdruck nicht zu groß wurde, um eine Schädigung des Lungengewebes und ein Kollabieren der Atemwege zu vermeiden. Schließlich wurde das Endoskop aus den Atemwegen herausgezogen. Im Anschluss daran wurden die Fohlen in Seitenlage verbracht und während der Aufwach- und Aufstehphase unter Beobachtung gehalten. Beim Aufstehen wurde den Fohlen durch zwei Personen geholfen.

Aufbereitung der BALF

Volumen der zurückgewonnenen BALF

Zunächst wird das Volumen der zurückgewonnenen bronchoalveolären Spülflüssigkeit (BALF) bestimmt. Ist es das Ziel der Untersuchung eine Information über die Atemwege und den Alveolarraum zu erhalten, wird die gesamte BALF ausgewertet. Ist hingegen lediglich der Alveolarbereich von Interesse, zum Beispiel bei pharmakokinetischen Untersuchungen, wird die erste zurückgewonnene BALF-Fraktion verworfen. Die entsprechenden BALF-Fraktionen werden anschließend, nach dem Spülvorgang vereint und gemischt.

Bestimmung der Gesamtzellzahl in der BALF und Differenzierung der Zellen

Die Zellzahl der BALF wurde in der sogenannten Nativlösung ermittelt. Dazu wurde zunächst die BALF durch eine Lage Mull filtriert. Anschließend wurden 10,0 µl der BALF in eine vorbereitete Neubauer Zählkammer pipettiert. Die Zählung der Zellen erfolgte mittels eines Mikroskops (Laboval 4, Zeiss, Jena, Deutschland) bei einer 40er Vergrößerung. Die vier auszählenden Leukozytenfelder befinden sich auf ein, fünf, sieben und elf Uhr auf der Zählkammer. Die Felder wurden mäanderförmig ausgezählt. Die Summe aller Leukozytenquadrate wurde mit 50 multipliziert, um den Zellgehalt pro Mikroliter Spüllösung zu erhalten.

Das Differenzialzellbild in der BALF wurde anhand von Zellausstrichen aus dem erhaltenen Sediment bestimmt. In den verschiedenen Studien wurde die BALF-Nativlösung in bei 1680 U/min für 10 Minuten zentrifugiert (Hettich Zentrifuge Universal 32). Darauf wurde der Überstand abpipettiert und das erhaltene Zellpellet in 1 ml PBS Lösung resuspendiert. Aus dem Zellpellet wurde ein Zellausstrich angefertigt, nach May-Grünwald gefärbt und unter dem Mikroskop betrachtet. Um den Anteil der einzelnen Zellfraktionen am Gesamtzellgehalt zu bestimmen wurden mindestens 200 Zellen, bei 1000facher Vergrößerung differenziert.

Der dekantierte Überstand und die resuspendierte Zelllösung wurden in Cryo Röhren pipettiert und eingefroren. Sie dienen der Konzentrationsbestimmung von Wirkstoffen in der BALF und in den bronchoalveolären Zellen.

Bestimmung der Konzentration eines Wirkstoffes in den Alveolarzellen

In pharmakokinetischen Studien, in denen die Konzentration eines Wirkstoffes in den bronchoalveolären Zellen (BAZ) bestimmt werden soll, wird zunächst die Konzentration des Wirkstoffes in einer bestimmten Menge an BAZs bestimmt. Hierzu wird die BALF zentrifugiert und das erhaltene Zellpellet, nach Dekantierung des Überstandes in einem definierten Volumen PBS-Lösung aufgenommen. Im Anschluss daran wird die Zellzahl ermittelt. Nun kann eine Zellzahl festgelegt werden (z. B. 5×10^6 Zellen) die in einer entsprechenden Menge Flüssigkeit entnommen wird. Diese Zellen werden bei 4°C durch weiteres zentrifugieren und resuspendieren in PBS-Lösung gewaschen. Bevor die Konzentration des Wirkstoffes in den Zellen bestimmt werden kann, werden die Zellwände aufgeschlossen. Ein Zellaufschluss kann z. B. im Ultraschallbad stattfinden. Der weitere Aufbereitungsprozess und die chromatographische Messung erfolgt wie bei anderen Proben auch. Das Ergebnis beschreibt eine Konzentration für eine bestimmte Menge an BAZs (z. B. Konzentration/GZ). Um die Konzentration in den Zellen besser mit jenen des Plasmas oder der BALF/PELF vergleichen zu können, kann man diese auf ein Zellvolumen umrechnen. Das Zellvolumen der BAZs beim Fohlen wird derzeit auf den Wert von $1,2 \mu\text{l}/\text{GZ}$ geschätzt (Jacks et al. 2001).

Ergebnisse

Das Volumen der zurückgewonnenen Spülflüssigkeit betrug bei 34 Fohlen in 168 durchgeführten BALs angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung 62 ± 14 % (Höhensteiger 2005, Schock 2008, Block 2010), siehe Tabelle 1.

Die Ergebnisse der Bestimmung des Differenzialzellbildes in der BALF von 34 Fohlen aus den genannten Untersuchungen sind in Tabelle 2 zusammengefasst. In den vorliegenden Untersuchungen lag die Gesamtzellzahl der Fohlen bei $14 \pm 5,8$ G/L (Höhensteiger 2005: $15,1 \pm 6$ G/L) (Schock 2008: $11,5 \pm 5$ G/L). Die Angabe beschränkt sich hier auf 25 durchgeführten BALs da die Fohlen im weiteren Verlauf der Untersuchungen, bevor eine weitere BAL durchgeführt wurde, aus Studiengründen therapiert worden sind und die Werte deshalb nicht mehr denen gesunder Fohlen entsprechen könnten. Die wiederholten BALs sind insofern in Bezug auf das Differenzialzellbild für die Etablierung von Referenzwerten für Fohlen nicht berücksichtigt worden.

Zum Vergleich des Differenzialzellbildes in der BALF beim Fohlen mit dem entsprechenden adulten Pferde sind in Tabelle 3 Ergebnisse verschiedener Untersuchungen beim adulten Pferd angegeben.

Beeinträchtigung der Fohlen durch die BAL

Alle Fohlen in den Studien von Höhensteiger (2005), Schock (2008) und Block (2010) wurden nach der Durchführung der BAL zweimal im Abstand von zwei Tagen und bis zum Absetzen wöchentlich, klinisch und die Lunge sonographisch unter-

Tab. 1 Volumina der zurückgewonnenen BALF bei 34 gesunden Warmblutfohlen in 168 ausgewerteten, endoskopisch durchgeführten BALs.
Volums of the BALF in 34 healthy foals in 168 BALs

Autor	Höhensteiger 2005	Schock 2008	Block 2010
Anzahl der Fohlen	17	10	9
Anzahl der durchgeführten BALs	95	55	18
Menge der jeweils instillierten Flüssigkeit in ml	200	200	400
Menge der rückgewonnenen Spülflüssigkeit in ml (MW \pm SD)	$122 \pm 29,8$	$128,2 \pm 24,5$	$242,3 \pm 40,4$
Menge der rückgewonnenen Spülflüssigkeit in % (MW \pm SD)	$61 \pm 14,9$	$64,1 \pm 12,3$	$60,6 \pm 10,1$

MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung / mean and standard deviation

Tab. 2 Differenzialzellbild in der BALF bei 34 gesunden Warmblutfohlen in 34 ausgewerteten, endoskopisch durchgeführten BALs (MW \pm SD)
Cell differential in the BALF of 34 healthy foals

Autor	Höhensteiger 2005 [#]	Schock [#]	Block [*]
Anzahl der Fohlen	17	8	9
Menge der instillierten Flüssigkeit in ml	200	200	400
Makrophagen in %	$74,2 \pm 16,5$	$71,4 \pm 5,8$	$79,9 \pm 2,4$
Lymphozyten in %	$18,6 \pm 14,1$	$17,4 \pm 7,9$	$14,8 \pm 2,9$
Neutrophile in %	$4,6 \pm 5,8$	$3,6 \pm 3,2$	0 ± 0
Mastzellen in %	$0,2 \pm 0,4$	$0,5 \pm 0,8$	$5,3 \pm 2,1$
Epithelzellen in %	$1,3 \pm 4,8$	$4,6 \pm 3,6$	n.e.
Riesenzellen in %	$2,7 \pm 1,7$	$1,2 \pm 1$	n.e.

MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, n.e.: nicht erhoben, [#] erste zurückgewonnene Fraktion der BALF zur Bestimmung des Differenzialzellbildes wurde nicht verworfen, ^{*} erste zurückgewonnene Fraktion der BALF wurde nach der Bestimmung des Volumens verworfen.

[#] first fraction of BAL was used, ^{*} first fraction of BAL was discarded after evaluation of the total volume

sucht. Bei den insgesamt 168 durchgeführten BALs, die hier zusammengefasst sind, wurden bei keinem der 34 Fohlen krankhafte Befunde erhoben. Dies zeigt, dass neben der einzelnen durchgeführten BAL an einem Fohlen auch die Wiederholung einer BAL für das gesunde Fohlen keine Gefährdung der Gesundheit darstellt. So wurden die BALs in der Studie von *Höhensteiger* (2005) mit insgesamt 6 Fohlen viermal Abstand von sieben Tagen BALs durchgeführt (Tag 1, 8, 15 und 22), mit 12 Fohlen wurden im Anschluss an diese vier BALs weitere zwei BALs im Abstand von 16 und weiteren sieben Tagen durchgeführt (Tag 38 und 45). Bei *Schock* (2008) wurden ebenfalls BALs wiederholt durchgeführt. Hier umfasste die Studie 10 Fohlen, bei denen an Tag 1, 8, 24, 31 und

45 eine BAL durchgeführt wurde. Bei *Block* (2010) erfolgte die Durchführung der BAL zweimal im Abstand von 14 Tagen an insgesamt 9 Fohlen. In den Tabellen 4, 5 und 6 sind die Anteile der einzelnen Zellfraktionen an der Gesamtzellzahl in der BALF nach wiederholt durchgeführten BALs für die einzelnen Untersuchungen dargestellt.

Bestimmung der Pulmonary Epithelial Lining Fluid

In der Studie von *Block* (2010) wurde im Rahmen der BAL zusätzlich das Volumen der Pulmonary Epithelial Lining Fluid (PELF) aus der BALF rechnerisch bestimmt werden. Die PELF

Tab. 3 Differenzialzellbild und Gesamtzellzahl der BALF beim gesunden, adulten Pferd (Mittelwert \pm Standardabweichung)
Cell differential and total cell count in the BALF in adult horses (mean and standard deviation)

Autor	McKane 1993	Fey 2004	Derksen 1989	Traub-Dargatz 1988	Sweeney 1994	Lapointe 1994
Anzahl der Pferde	62	10	10	9	7	6
Alter d. Pferde (Jahre)	2,8 \pm 1	10,6 \pm 5	6,9 \pm 2	4 - 14	8,8 \pm 5	12,5 \pm 5
Menge der instillierten Flüssigkeit in ml	65	60ml/100 kg KGW*	300	180 - 500	300	500
Makrophagen in %	59 \pm 10	32 \pm 12	45 \pm 3	31 \pm 6	46 \pm 11	26 \pm 6
Lymphozyten in %	31 \pm 9	62 \pm 12	43 \pm 3	60 \pm 6	47 \pm 11	69 \pm 3
Neutrophile in %	9 \pm 6,3	2,76	9 \pm 1,2	5 \pm 1,6	2,3 \pm 2	2,2 \pm 2
Mastzellen in %	n.e.	1,75	1,2	2,7 \pm 0,7	4,4 \pm 2	0,2 \pm 0,3
Eosinophile in %	0,5 \pm 3	0 \pm 0	< 1	1,2	0 \pm 0	0 \pm 0
Epithelzellen in %	0,4 \pm 0,8	n.e.	3,5 \pm 0,7	0,9 \pm 0,6	n.e.	n.e.

KGW: Körpergewicht, *533 \pm 106 kg; n.e.; nicht erhoben

Tab. 4 Anteil der verschiedenen Zellen am Gesamtzellbild in der BALF von 18 Warmblutfohlen und 95 auswertbaren BALs (*Höhensteiger* 2005). (Mittelwert \pm Standardabweichung) / Cell differential and total cell count in the BALF of 18 healthy foals and 95 BALs (*Höhensteiger* 2005) (mean and standard deviation)

Zellen in %	1. BAL [#] Tag 1	2. BAL [#] Tag 8	3. BAL [#] Tag 15	4. BAL [#] Tag 22	5. BAL* Tag 38	6. BAL* Tag 45
Makrophagen	74 \pm 16	71 \pm 15	70 \pm 12	63 \pm 12	78 \pm 9	61 \pm 23
Lymphozyten	18 \pm 14	19 \pm 16	23 \pm 13	28 \pm 16	17 \pm 9,7	33 \pm 25
Neutrophile	4,6 \pm 5,8	4,7 \pm 3,8	2,4 \pm 2,1	3,3 \pm 4,5	2,9 \pm 2,5	1,9 \pm 1,6
Mastzellen	0,2 \pm 0,4	0,2 \pm 0,4	0,7 \pm 1,4	0,1 \pm 0,3	0,1 \pm 0,3	0,1 \pm 0,3
Epithelzellen	1,3 \pm 4,8	3,3 \pm 6,5	2,3 \pm 2,9	4,3 \pm 6,4	0,8 \pm 1,5	2,8 \pm 2,6
Riesenzellen	1,2 \pm 1	1,4 \pm 1,3	1,4 \pm 1,1	1,4 \pm 1,3	1,4 \pm 1,1	1,3 \pm 1,0
Gesamtzell-zahl in G/L	15,1 \pm 6	14,1 \pm 5,3	16,4 \pm 6,1	18,4 \pm 7,6	21,4 \pm 10,5	27,4 \pm 18,5

[#] n = 18, * n = 12, BAL: Bronchoalveoläre Lavage

Tab. 5 Anteil der verschiedenen Zellen am Gesamtzellbild in der BALF von 10 Warmblutfohlen und 55 auswertbaren BALs (*Schock* 2008) (Mittelwert \pm Standardabweichung) / Cell differential and total cell count in the BALF of 10 healthy foals and 55 BALs (*Schock* 2008) (mean and standard deviation)

Zellen in %	1. BAL Tag 1	2. BAL Tag 8	3. BAL Tag 8	4. BAL Tag 24	5. BAL Tag 31	6. BAL Tag 45
Makrophagen	71 \pm 6	71 \pm 6	71 \pm 6	73 \pm 4	71 \pm 5	74 \pm 6
Lymphozyten	17 \pm 8	18 \pm 5	16 \pm 5	16 \pm 3	167 \pm 3	17 \pm 4
Neutrophile	3,6 \pm 3,2	2,8 \pm 3,0	3,8 \pm 2,6	2,5 \pm 1,3	2,5 \pm 1,1	1,6 \pm 1,7
Mastzellen	0,5 \pm 0,8	0,2 \pm 0,3	0,1 \pm 0,2	0 \pm 0	0,1 \pm 0,3	0,1 \pm 0,2
Epithelzellen	4,6 \pm 3,6	5 \pm 3,7	4,9 \pm 3,9	4,4 \pm 2,6	6 \pm 3,1	4,7 \pm 3,3
Riesenzellen	2,7 \pm 1,7	3,3 \pm 1,8	3,3 \pm 1,7	4,2 \pm 2,0	3 \pm 1,6	2,9 \pm 1,7
Gesamtzell-zahl in G/L	11,5 \pm 5	10,9 \pm 4	18,9 \pm 8	22,7 \pm 9	22,8 \pm 12	25,4 \pm 10

BAL: Bronchoalveoläre Lavage

Tab. 6 Anteil der verschiedenen Zellen am Gesamtzellbild in der BALF von 9 Warmblutfohlen und 18 auswertbaren BALs (Block 2010) (Mittelwert \pm Standardabweichung) / *Cell differential in the BALF of 9 healthy foals and 18 BALs (Block 2010) (mean and standard deviation)*

Zellen in %	1. BAL Tag 7	2. BAL Tag 21
Makrophagen	79,9 \pm 2,4	81,9 \pm 8,4
Lymphozyten	14,8 \pm 2,9	14,6 \pm 6,3
Neutrophile Granulozyten	0 \pm 0	0,5 \pm 0,71
Mastzellen	5,3 \pm 2,1	3,1 \pm 2,3

BAL: Bronchoalveoläre Lavage

Tab. 7 Berechnetes Volumen der PELF bei neun Warmblutfohlen in 18 durchgeführten BALs (Mittelwerte \pm Standardabweichung) / *Calculated volum of PELF in 9 healthy foals and 18 BALs (mean and Standard deviation)*

Block 2010	1. BAL	2. BAL
Volumen der PELF in ml	16,32 \pm 5,65	14,59 \pm 7,19
Volumen der BALF in ml	234,7 \pm 45,5	250 \pm 35,5

BAL: Bronchoalveoläre Lavage, PELF: Pulmonary Epithelilal Lining Fluid, BALF: Bronchoalveoläre Spülflüssigkeit

beschreibt das Volumen der Flüssigkeit, die im Alveolarraum die Alveolarzellen bedeckt. Zur Berechnung dieses kleinen Volumens, welches in der BALF enthalten ist wird auf der Grundlage der Harnstoffkonzentration im Plasma und in der BALF die Gleichung von *Rennard* (1986) verwendet. Für neun Fohlen wurde so das Volumen der PELF bestimmt. Die einzelnen Werte sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Diskussion

Die BAL besitzt ihren Stellenwert als diagnostische Maßnahme vor allem in der Abklärung von Leistungsschwäche bei jungen Hochleistungspferden (*Viel* und *Hewson* 2003) und in der Diagnostik von Erkrankungen des Lungenparenchyms. Darüber hinaus findet die BAL ihr Einsatzgebiet in experimentellen Untersuchungen zur Recurrent Airway Obstruction (RAO) und in pharmakologischen Studien zur Bestimmung von Wirkstoffkonzentrationen in der BALF, PELF und in bronchoalveolären Zellen, bei erwachsenen Pferden und bei Fohlen.

In den vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine schonende Methode zur Durchführung der BAL beim Fohlen etabliert wurde. Im Gegensatz zum erwachsenen Pferd sollte die BAL beim Fohlen transendoskopisch und in Allgemeinanästhesie erfolgen. Der Grund hierfür ist, dass sedierte Fohlen schreckhaft bleiben und spontane Abwehrreaktionen unweigerlich dazu führen, dass das eingekeilte Endoskop ruckartig den Bronchus verlässt und die Menge der zurückgewonnenen BALF wesentlich geringer wird. Da es für eine diagnostische Aussage aber genau auf eine standardisierte Menge der BALF ankommt, sollte eine Methode angewendet werden, die nur geringe Schwankungen der Rückgewinnungsrate sichert. Zusätzlich werden durch diese Methode Verletzungen des Respirationstraktes durch unkontrollierte Bewegungen des Endoskops in der Lunge vermieden.

Die transendoskopische Methode weist gegenüber der Durchführung der BAL mithilfe eines BAL-Katheters Vorteile auf. Durch die Sichtkontrolle ist neben der optischen Beurteilung von Menge und Viskosität der Sekrete in der Luftröhre und in den Bronchien, sowie der Beschaffenheit der Schleimhaut, auch die gezielte Wahl einer Lungenseite und des Bronchus möglich (*Ganter* et al. 1993, *McKenzy* 2005). Ein weiterer Vorteil der transendoskopischen Methode ist die hohe

Rückgewinnungsrate, welche gemäß humanmedizinischen Standards wesentlich die Aussagekraft der BALF beeinflusst (*Costabel* et al. 1989). Beim Menschen gilt, dass erst wenn mehr als 50% der eingegebenen Flüssigkeit rückgewonnen wird, sichergestellt ist, dass der Alveolarraum gespült wurde und erst dann gilt die BALF als verwertbar.

Zur Standardisierung der Methode ist zu beachten, dass der Durchmesser des Endoskops entscheidend dafür wie tief es eingeführt wird und also wie viel Bronchialraum und Alveolarraum gespült werden. So schließt ein Endoskop mit einem Durchmesser von 10-13 mm zum Beispiel einen Bronchus der 4./5. Generation (*Hewson* und *Viel* 2010). Es sollte also ein möglichst geringer Durchmesser gewählt werden, um ein repräsentatives Zellbild aus den tiefen Atemwegen, vor allem aus dem Alveolarbereich zu erhalten.

Die Gesamtmenge der für die BAL instillierten Flüssigkeit sollte 400 ml betragen, da kleinere Volumina den Nachteil haben, dass nur die Bronchiolen, nicht aber die Alveolen gespült werden und das erhaltene Zellbild nicht dem der Alveolen entspricht (*Sweeney* et al. 1992, *Clark* et al. 1995). In der Studie von *Block* (2010) wurde dieses Volumen an neun Fohlen in 18 durchgeführten BALs verwendet und stellte keine Beeinträchtigung der Fohlen dar.

Zur Durchführung einer BAL sollte grundsätzlich PBS-Lösung verwendet werden, da diese isotonisch ist, einen physiologischen pH-Wert aufweist und somit die Zellen des Bronchialepithels und der Alveolenwände und außerdem die Zellen der BALF nicht schädigt. Darüber hinaus ist es anzustreben, die instillierte Flüssigkeit zuvor auf 37°C zu erwärmen, um bei der Durchführung der Lavage einen Bronchospasmus zu verhindern, der wiederum die Rückgewinnungsrate deutlich senken würde (*Hewson* und *Viel* 2002). Bei der Rückgewinnung der BALF ist es wichtig, dass der Unterdruck mit dem die Flüssigkeit aus den tiefen Atemwegen zurückgewonnen wird nicht zu groß wird, um ein Kollabieren der kleinen Atemwege und ein Trauma des Epithels zu vermeiden.

Die vorgeschlagenen Referenzbereiche für die Gesamtzellzahl in der BALF beim Pferd variieren in sehr weiten Bereichen. In der Regel liegen die Zellzahlen unter 10⁹ Zellen/Liter (*DeHeer* et al. 2002) mit einem oberen Limit von 4 x 10⁸ Zellen/Liter (*Hewson* und *Viel* (2002). Die unterschiedlichen Gesamtzell-

zahlen in der BALF führen dazu, dass einige Autoren die absolute Zellzahl für die klinische Diagnostik als wertlos erachten (Zink 2002, Viel und Hewson 2003). Dies kann sich nur durch einen Konsens über die Standardisierung der BAL-Methode ändern. In den vorliegenden Untersuchungen lag die Gesamtzellzahl der Fohlen bei $14 \pm 5,8$ G/L (Höhensteiger 2005, Schock 2008), sie ist damit etwa doppelt so hoch wie den angegebenen des adulten Pferdes mit $6,2 \pm 2,7$ G/L (Venner 2003).

Den Hauptanteil an der Gesamtzellzahl tragen beim adulten Pferd und beim Fohlen die bronchoalveolären Makrophagen. Der prozentuale Anteil der Makrophagen in der BALF beim Fohlen mit $73,3 \pm 13,9$ % (Höhensteiger 2005, Schock 2008) liegt etwas über dem prozentualen Anteil dieser Zellfraktion an der Gesamtzellzahl beim adulten Pferd mit 45-70 %. In der BALF gesunder Pferde wird außerdem ein hoher Anteil an Lymphozyten nachgewiesen (Fey 2004). In der BALF der Fohlen ist der Anteil der Lymphozyten an der Gesamtzellzahl im Vergleich zum adulten Pferd (30-50%) mit nur $18,2 \pm 12,3$ % (Höhensteiger 2005, Schock 2008) geringer. Möglicherweise lässt sich dies durch die noch nicht vollständig ausgeprägte bronchiale Immunität der Fohlen erklären. Der Prozentuale Anteil der Mastzellen mit $0,3 \pm 0,5$ % (Höhensteiger 2005, Schock 2008) und der neutrophilen Granulozyten mit 4 ± 5 % (Höhensteiger 2005, Schock 2008) in der BALF bei insgesamt 34 Fohlen (s.o.) entspricht den angegebenen Referenzwerten adulter Pferde (Tab. 3).

Wenn die erste Spülfraktion der BAL benutzt wird, wird die Zellreiche bronchiale Fraktion berücksichtigt und der Anteil der neutrophilen Granulozyten in der BALF steigt (Hewson und Viel 2002). Zur Betrachtung des Differenzialzellbildes in der BALF ist es deshalb von Bedeutung, ob die erste zurückgewonnene Fraktion der BALF mit in die Differenzierung einbezogen wird oder nicht. Aus diesem Grunde wurden hier die Ergebnisse der zwei älteren Studien diskutiert (Höhensteiger 2005, Schock 2008).

Bei den wiederholten BAL-Vorgängen stieg die Gesamtzellzahl der BALF in den Studien von Höhensteiger (2005) und Schock (2008) zwar an, aber das Differentialbild und insbesondere der Anteil der neutrophilen Granulozyten blieben stabil, so dass keine bedeutende Entzündung der Atemwege durch die hier angewandte BAL-Methode induziert wurde. Auch beim Menschen (Petro et al. 1990) und beim erwachsenen Pferd (Venner 2003, Fey 2004) konnte die hohe Sicherheit dieser Untersuchungsmethode mehrfach gezeigt werden.

Im Rahmen einer BAL kann zusätzlich das Volumen der Pulmonary Epithelial Lining Fluid (PELF) aus der BALF rechnerisch bestimmt werden. Die PELF beschreibt die Flüssigkeit, die im Alveolarraum die Alveolarzellen umgibt. Durch die Bestimmung der Menge der PELF ist es möglich, die aktuellen Konzentrationen verschiedener Molekülen, z. B. Entzündungsparameter oder Pharmaka in Situ zu bestimmen (Rennard et al. 1986). Entzündungsparameter in der PELF und Differentialbild der BALF werden zur näheren Charakterisierung der Alveolitis herangezogen.

Die Konzentration von Pharmaka in der PELF ist in der Behandlung von intrapulmonalen Krankheitserregern von

großer Bedeutung. So wird bei neuen Wirkstoffen die Konzentration in der PELF über die Bestimmung Volums der PELF berechnet. Hierzu wird der Harnstoff im Plasma und in der BALF bestimmt. Da der Harnstoff in der PELF isoton zu dem Plasmawert ist, lässt sich daraus und mit der Gleichung von Rennard (1986) das Volumen der PELF berechnen. Bei der Interpretation des Volums der PELF ist allerdings zu bedenken, dass die Methode fehleranfällig ist. So kann es durch wiederholte Spülprozesse zu einer gesteigerten Diffusion von Harnstoff in die Alveolen kommen, so dass eine zu hohe Harnstoffkonzentration in der BALF gemessen wird, was wiederum zu einer Überschätzung des Volumens der PELF führen kann (Peterson et al. 1993). Um diesen Fehler in verschiedenen Untersuchungen gering zu halten, ist es entscheidend, die BAL nach einer standardisierten Methode durchzuführen. Dabei müssen Menge der Spülflüssigkeit, Anzahl der Spülvorgänge und Dauer des Spülprozesses festgelegt sein. Nur so kann gewährleistet werden, dass die Ergebnisse wenig streuen und dass Ergebnisse unterschiedlicher Studien vergleichbar sind (Costabel 1989).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass auch für das Fohlen eine schonende, standardisierbare Methode zur Durchführung der BAL für diagnostische und pharmakologische Fragestellungen zur Verfügung steht.

Literatur

- Bain F. T. (1997) Cytology of the respiratory tract. Vet. Clin. North. Am. Equine Pract. 13, 477-486
- Block W. (2010) Pharmakokinetik von Clarithromycin nach der Monotherapie mit Clarithromycin und nach der kombinierten Gabe von Clarithromycin mit Rifampicin beim Fohlen. Diss. Med. Vet. Hannover
- Clark C. K., Lester G. D., Vetro T. und Rice B. (1995) Bronchoalveolar Lavage in horses: effect of exercise and repeated sampling on cytology. Aust. Vet. J. 72, 249-252
- Costabel U. (1989) Technical recommendations and guidelines for bronchoalveolar lavage. Task group report. Europ. Respir. J. 2, 561-585
- Derksen F. J., Robinson N. E., Slocombe R. F. und Scott J. S. (1985) Bronchoalveoläre Lavage-Zytologie bei Ponies mit chronischer Atemwegserkrankung. Pferdeheilkunde 1, Suppl. 1, 25-28
- Derksen F. J., Brown C. M. und Sonea I. (1989) Comparison of trans-tracheal aspirate and bronchoalveolar lavage cytology in 50 horses with chronic lung disease. Equine Vet. J. 21, 23-26
- Fey K. (2004) Der klinische Nutzen zytologischer Untersuchungen von BALF bei der Differenzierung chronischer Bronchitiden des Pferdes. Habil. Med. Vet. Gießen
- Fogarty U. (1990) A bronchoalveolar lavage technique for routine diagnostic purposes. Equine Vet. Educ. 2, 102-104
- Ganter M., Kipper S., Schöttger-Wegener H., Beckmann G. und Bunka S. (1993) Pneumoniediagnostik am lebenden Schwein mit Hilfe der Lungenspülung. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 106, 330-333
- Hoffman A. M., Viel L. und Muckle C. A. (1991) Evaluation of a guarded bronchoscopic method for microbial sampling of the lower airways in foals. Can. J. Vet. Res. 55, 325-331
- Höhensteiger N. (2005) Nachweis der Konzentration von Tulathromycin im Plasma und in der BALF beim Fohlen mittels HPLC-MS-MS nach i.m. Appl. mit u ohne Kombination von Rifampicin. Diss. Med. Vet. Hannover
- Jacks S., Giguère S., Gronwall R., Brown M., Kelly A. und Merritt B. S. (2001) Pharmacokinetics of azithromycin and concentration in body fluids and bronchoalveolar cells in foals. Am. J. Vet. Res. 62, 1870-1875

- LaPointe J. M., Vrins A. und Lavoie J. P.* (1994) Effects of centrifugation and specimen preparation technique on bronchoalveolar lavage analysis in horses. *Equine Vet. J.* 26, 227-229
- May A. und Gehlen H.* (2009) Durchführung, Analyse und Aussagekraft von Tracheobronchialsekret (TBS) und Bronchoalveolärer Lavage (BAL) bei Pferden mit Lungenerkrankungen. *Pferdeheilkunde* 25, 310-320
- Mc Kane S. A., Canfield P. J. und Rose R. J.* (1993) Equine BAL cytology: survey of thoroughbred racehorses in training. *Aust. Vet. J.* 70, 401-404
- Peterson B. T., Griffith D. E., Tate D. und Clancy S. J.* (1993) Single-cycle BAL to determine solute concentrations in epithelial lining fluid. *Am. Rev. Respir. Dis.* 147, 1216-1222
- Petro W., Lindner O. und Kaspar U. P.* (1990) Bronchoalveoläre Lavage: Durchführung und Sicherheit. In: Stellenwert der bronchoalveolären Lavage in der pneumologischen Diagnostik. Hrsg: Magnusson u. Nolte. Dustri-Verlag, München-Deisenhofen. 1-12
- Rennard S., Basset G., Lecossier D., O'Donnell K., Martin P. und Crystal R.* (1986) Estimation of volume of epithelial lining fluid recovered by lavage using urea as marker of dilution. *J. Appl. Physiol.* 60, 532-538
- Rush B. und Mair T.* (2004) *Equine respiratory diseases.* Blackwell Publishing, Oxford
- Schock B.* (2008) Single-dose und Steady-State Kinetik von Tulathromycin beim Fohlen. *Diss. Med. Vet. Hannover*
- Sweeney C. R., Rossier Y., Ziemer E. L. und Lindborg L.* (1992) Effects of lung site and fluid volume on results of BAL fluid analysis in horses. *Am. J. Vet. Res.* 53, 1376-1379
- Sweeney C. R., Rossier Y. und Ziemer E. L.* (1994) Effect of prior lavage on bronchoalveolar lavage fluid cell population of lavaged and unlavaged lung segments in horses. *Am. J. Vet. Res.* 55, 1501-1504
- Traub-Dargatz J. L., McKinnon A. O. und Bruyninckx W. J.* (1988) Effect of transportation stress on BALF analysis in female horses. *Am. J. Vet. Res.* 49, 1026-1029
- Venner M.* (2003) Akute interstitielle Pneumopathie beim Pferd – Experimentelle Induktion mit Perilla-Keton. PhD-These, Hannover
- Viel L.* (1980) Structural functional correlations of the lung in horses with small airway disease. *Diss. Med. Vet. Guelph, University of Guelph, Canada*
- Viel L. und Hewson J.* (2003) Bronchoalveolar Lavage. In: *Current Therapy in Equine Medicine* 5. Ed.: Robinson, Saunders, St. Louis (2003) 407-411
- Wehrli Eser M., Feige K., Franchini M. Kästner S. und Geissbühler U.* (2000) Untersuchung zur Technik und Aussagekraft einer bronchoalveolären Lavage (BAL), durchgeführt mit Hilfe eines flexiblen Silikonkatheters ohne endoskopische Kontrolle. *Pferdeheilkunde* 16, 373-378
- Zink, L. J. G.* (2002) Lower Respiratory Tract. In: *Diagnostic Cytology and Hematology of the Horse* 2nd Ed.: Schreffer J. A; Mosby, St. Louis/USA 73-86

PD PhD Dr. Monica Venner
 Tierärztliche Klinik für Pferde Gut Destedt
 Trift 4
 38162 Destedt
 mvenner@gmx.de