

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

Paula J. Pöhlig, Philip Schmitz und Heidrun Gehlen

Klinik für Pferde, allgemeine Chirurgie und Radiologie, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin

Zusammenfassung: Ziel dieser Arbeit war der Vergleich zytologischer Ergebnisse und Verdachtsdiagnosen zwischen und innerhalb verschiedener Labore, um die Zuverlässigkeit der zytologischen Untersuchung von Tracheobronchialsekret (TBS) und Bronchoalveolärer Lavage (BAL) als diagnostisches Mittel zur Diagnosestellung von equinem Asthma zu überprüfen. Als Studienpopulation standen 15 Pferde zur Verfügung, die zur Abklärung respiratorischer Symptome vorgestellt wurden. Im Rahmen der Atemwegsuntersuchungen erfolgte zunächst die Diagnosestellung in der Klinik für Pferde der Freien Universität Berlin. Im Anschluss erfolgte der Versand von unterschiedlichen luftgetrockneten Ausstrichen aus den gleichen TBS- und BAL-Proben der Studienpferde an vier Fremdlabore sowie zusätzlich eine verblindete zytologische Beurteilung der Ausstriche durch zwei klinikerne Untersucher. Die Angaben zur Differentialzellzählung der zytologischen Auswertung des TBS und der BAL wiesen bei den Fremdlaboren z.T. erhebliche Unterschiede auf. Zum einen wurden semiquantitative Angaben, zum anderen Prozentzahlen bei der Differentialzellzählung angegeben. Um die interindividuelle Varianz der Ergebnisse verschiedener Labore beurteilen zu können, wurde ein vereinheitlichtes Scoring System zur zytologischen Befundung von TBS und BAL erarbeitet. Beim Vergleich der intraindividuellen Übereinstimmung der Ergebnisse konnte bestätigt werden, dass eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse zur Anzahl der neutrophilen Granulozyten bei fast allen Laboren und Untersuchern 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 eine gute Übereinstimmung. Die semiquantitativen Angaben resultieren in einer geringeren Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu den Zellarten der Differentialzellzählung innerhalb anderer Labore. 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 $\alpha > 0,7$). 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 fünf Pferden die Diagnose einer bakteriellen Bronchitis. Somit konnten einige intra- und interindividuellen Unterschiede der zytologischen Ergebnisse und der Verdachtsdiagnosen zwischen und innerhalb der Labore festgestellt werden. Es kann geschlossen werden, dass die zytologische Untersuchung nur zu einem kleinen Teil zur endgültigen Diagnosestellung herangezogen werden sollte und die klinischen Befunde den größten Einfluss auf die Diagnose und damit die weitere Therapie haben sollten. Darüber hinaus besteht der Bedarf 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.

Schlüsselwörter: Equines Asthma, Tracheobronchialsekret, bronchoalveoläre Lavage, zytologische Untersuchung, Differentialzellzählung, Diagnostik, intra- und interindividuelle Varianz

Evaluation of the reliability of the cytological examination of tracheobronchial secretions and bronchoalveolar lavage for the diagnostics 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 signs. Initially, the anamnesis was taken, respiratory tract examinations were performed on all horses, and the findings from the clinical, endoscopic, and cytological examinations and the anamnesis 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. Different air-dried smears of the same TBS- and BAL-samples from the study horses were then sent to four external laboratories and were additionally 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 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 comparison of 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 the number of 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 the number of 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. When comparing results between all laboratories, good reproducibility was also achieved for the number of neutrophil granulocytes in BAL and TBS (Krippendorff's $\alpha > 0,7$). The results for all other cell types of differential cell counts varied more between the laboratories. Healthy horses were frequently diagnosed with mild to moderate equine asthma by the external laboratories. In horses with respiratory disorders, 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. Therefore, it can be concluded that cytological examination should only be used as a small part of the final diagnosis, and the anamnesis, clinical signs and findings of endoscopy should have the greatest influence on the diagnosis and subsequent therapy. Without detailed information on clinical signs 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 a more standardized evaluation.

Keywords: Equine asthma, tracheobronchial secretion, bronchoalveolar lavage, cytological examination, differential cell count, diagnostics, intra- and interindividual agreement

Zitation: Pöhlig PJ, Schmitz P, Gehlen H (2024) Überprüfung der Zuverlässigkeit der zytologischen Untersuchung von Tracheobronchialsekret und bronchoalveolärer Lavage als Mittel zur Diagnosestellung von equinem Asthma. *Pferdeheilk Equine Med* 40, 463–472; DOI 10.21836/PEM20240505

Korrespondenz: Julia Pöhlig, Freie Universität Berlin, Klinik für Pferde, Oertzenweg 19b, 14163 Berlin; julia-poehlig@gmx.de

Eingereicht: 7. März 2024 | **Angenommen:** 27. Mai 2024

Einleitung

Equines Asthma ist eine häufig vorkommende chronische Erkrankung der Atemwege und kann Pferde jeden Alters betreffen^[1–5]. Die Erkrankung wird abhängig von den klinischen, endoskopischen und zytologischen Befunden in mildes bis moderates (MEA) und schweres equines Asthma (SEA) eingeteilt^[4,6]. MEA geht unter anderem mit chronischem Husten einher und stellt eine wichtige Ursache für Leistungsinsuffizienz beim Pferd dar^[1,4,6]. Klinisch abzugrenzen von SEA ist es durch die fehlende Dyspnoe in Ruhe^[1,4,7,8]. Die Saisonalität der Symptome des equinen Asthmas ist nicht auf die Sommerzeit begrenzt. Die Weide-assoziierte obstruktive Lungenerkrankung (Summer pasture associated obstructive pulmonary disease, SPAOPD) zeigt dagegen eine klare Saisonalität der Symptome und führt im Sommer bei Weidehaltung zu respiratorischen Symptomen^[9]. Es konnte gezeigt werden, dass eine Verschlimmerung der Symptomatik bei Pferden mit SPAOPD mit heißem und feuchtem Klima in Verbindung steht^[9].

Bei jeder Atemwegsuntersuchung sollte die Aufnahme der Anamnese erfolgen und bei der Diagnosestellung von equinem Asthma berücksichtigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Anamnese als valider Faktor zur Diagnosestellung beiträgt^[10].

Neben einer speziellen klinischen Untersuchung des Atemtrakts, wird die zytologische Untersuchung von Tracheobronchialsekret (TBS) und Bronchoalveolärer Lavage (BAL) für die Diagnosestellung von equinem Asthma herangezogen^[4]. Die TBS- und BAL-Proben werden bei einer Untersuchung des Atemtraktes gewonnen und meist 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.

Die zytologischen Ergebnisse der Untersuchung von TBS- und BAL-Ausstrichen beim Pferd variieren allerdings nicht nur bei verschiedenen Krankheitszuständen, sondern ebenfalls durch Unterschiede in der Probenentnahme, Probenbearbeitung und der mikroskopischen Untersuchung. Die gleichen Beobachtungen beim Menschen haben dazu geführt, dass Standards in der Durchführung der BAL in Deutschland etabliert wurden.

Beim Pferd gibt es Potential für Variationen in der Durchführungstechnik der BAL, wobei in der Literatur beschrieben ist, dass die beprobte Lungenseite, die Tiefe der Probenentnahme, das instillierte Volumen, Separieren oder Poolen von Aliquoten und die Temperatur der Flüssigkeit bei der Instillation Einfluss auf die zytologischen Ergebnisse haben^[11–16]. Auch durch die Bearbeitung und Auswertung der Lungenproben kann es zu unterschiedlichen zytologischen Ergebnissen für das TBS und die BAL kommen. Studien haben gezeigt, dass die Zentrifugation der Proben, die Lagerungszeit, die Ausstrichetechnik, die Färbung, die Zellzählung und die Identifikation der Zellen Einfluss auf die zytologischen Ergebnisse haben^[16–25]. Aufgrund der möglichen Veränderungen innerhalb einzelner Zellpopulationen, die durch die genannten Aspekte entstehen können, wird empfohlen immer dieselbe Technik zur Probenentnahme und Anfertigung zytologischer Präparate zu verwenden^[19,26–28].

Die zytologische Untersuchung

Bei der zytologischen Untersuchung von TBS- und BAL-Präparaten werden unter anderem die Quantität und das Erscheinungsbild der Entzündungszellen beurteilt^[29]. Dabei stehen vor allem Alveolarmakrophagen, Lymphozyten, neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten und Mastzellen im Focus der Untersuchung^[24,29]. Bei der Schwere der Erkran-

kung wird auf die Anteile der Entzündungszellen an der Gesamtzellzahl sowie auf weitere Hinweise einer chronischen Entzündung geachtet^[4,6,30,31]. Bei der TBS-Analyse wird das Vorkommen einzelner Zellpopulationen meist semiquantitativ angegeben, da eine exakte quantitative Bestimmung der Zellpopulationen oft schwierig ist^[32,33]. Bei der BAL wird empfohlen eine Differentialzellzählung von 400–500 kernhaltiger Zellen pro Objektträger-Ausstrich durchzuführen und anschließend die Anteile der Zellarten am Gesamtzellbild als quantitative Werte in Prozent anzugeben^[4,34–36]. Die allgemein anerkannte zytologische Definition von MEA beschreibt eine milde Erhöhung des Anteils an neutrophilen Granulozyten von > 10 %, Mastzellen und/oder eosinophilen Granulozyten von > 5 %^[4,30,37–39]. Schweres equines Asthma geht mit einer deutlichen Erhöhung des Anteils an neutrophilen Granulozyten von > 25 % in der BAL einher^[4,15,40].

Mit dieser Studie sollte ein Vergleich zytologischer Ergebnisse und Verdachtsdiagnosen zwischen und innerhalb verschiedener, größerer und häufig von Praktikern genutzten Labore durchgeführt werden, um die Zuverlässigkeit der zytologischen Untersuchung von TBS und BAL als diagnostisches Mittel zur Diagnosestellung von equinem Asthma zu überprüfen. Es wurde angenommen, dass bei einem intra- und interindividuellen Vergleich zytologischer Ergebnisse von TBS und BAL innerhalb und zwischen mehreren Laboren (inter- und intraindividuelle Varianz) nur eine geringe oder gar keine Varianz der Ergebnisse und Verdachtsdiagnosen besteht und die Zytologie als zuverlässiges Kriterium zur Atemwegsdiagnostik herangezogen werden kann.

Material und Methoden

Atemwegsuntersuchung und Einteilung der Probanden

Als Studienpopulation standen 15 Pferde zur Verfügung, die zur Abklärung respiratorischer Symptome an der Klinik für Pferde vorgestellt wurden. Die Atemwegsuntersuchung beinhaltete eine ausführliche Anamnese, eine klinische Allgemeinuntersuchung, eine spezielle Untersuchung des Atemwegstraktes und die Entnahme von venösem und arteriellem Blut. Außerdem wurde eine Endoskopie der Atemwege inklusive der Entnahme von Tracheobronchialsekret (TBS) sowie eine Bronchoalveoläre Lavage (BAL) durchgeführt.

Für die 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. Das TBS wurde über einen Katheter im Arbeitskanal des Endoskops entnommen. Eine Tracheobronchiallavage wurde mit 20 ml einer sterilen Kochsalzlösung durchgeführt, wenn keine Sekretanheftungen in der Trachea vorhanden waren^[35]. Nach Entnahme des TBS wurde als Vorbereitung auf die bronchoalveoläre Lavage 20 ml einer 2%igen Lidocainhydrochloridlösung im dorsalen Bereich der Bifurcatio tracheae auf die Schleimhaut appliziert. Die BAL wurde blind mit Hilfe einer BAL-Sonde aus Silicon mit aufblasbarem Cuff, einer Länge von 300 cm und einem Außendurchmesser von 10 mm durchgeführt. Dann erfolgte die Eingabe von 300 ml steriler phosphatgepufferter und erwärmter Kochsalzlösung (PBS) über drei 100 ml Spritzen. Im Anschluss wurde

die Flüssigkeit durch dieselben 100 ml Spitzen wieder aspiriert und in das ursprüngliche Behältnis der phosphatgepufferten Kochsalzlösung gepoolt. Jedes Pferd wurde einmalig beprobt und die BAL bei allen Probanden identisch durchgeführt. Die Proben der Tracheobronchiallavage und der BAL wurden zunächst bei 1500 rpm für 10 min zentrifugiert, um eine ausreichende Zellularität zu erreichen. Anschließend wurden zytologische Ausstriche angefertigt und luftgetrocknet.

Im Rahmen der Abklärung respiratorischer Symptome der Patienten, erfolgte eine zytologische Untersuchung der Proben zunächst in der Klinik für Pferde. Die Färbung der Aus-

Tab. 1 Klinisches Scoring System nach Barton und Gehlen 2022. | *Clinical scoring system from Barton and 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

striche erfolgte hierfür mit einer Diff Quik Färbung (Haema Schnellfärbung, Firma: Labor und Technik Eberhard Lehmann GmbH). Die Befunde der zytologischen Untersuchung wurden zusammen mit den klinischen und endoskopischen Befunden sowie der Blutuntersuchung zur endgültigen Diagnosestellung in der Klinik herangezogen und mit Hilfe des Scoring Systems von Barton und Gehlen eingestuft (Tabelle 1)^[41].

Versand der Ausstriche

Im Anschluss erfolgte der Versand ungefärbter, luftgetrockneter Ausstriche von TBS und BAL der Studienpferde anonymisiert an vier Fremdlabore (Labore 1–4). Zusätzlich wurden Ausstriche mit einer Diff-Quik Färbung angefärbt und durch zwei verblindete klinikinterne Untersucher A und B beurteilt. Für die Fremdlabore und die klinikinternen Untersucher wurde ein doppelt verblinder Ansatz der TBS- und BAL-Proben von jedem Pferd angefertigt, sodass aus den Proben eines Pferdes zwei Proben a und b des gleichen Pferdes geschaffen wurden. Somit wurden aus den beprobten 15 Pferden 30 neue „fiktive“ Pferde, sodass jedes Labor und jeder Untersucher zwei Mal die Proben des gleichen Pferdes untersuchten. Auf diese Weise konnte eine intra- und interindividuelle Übereinstimmung der zytologischen Ergebnisse desselben Pferdes überprüft werden.

Intraindividuelle Varianz

Im ersten Teil der Studie wurde die Übereinstimmung der zytologischen Untersuchung innerhalb der Fremdlabore und der Untersucher A und B der eigenen Klinik überprüft. Jedes Pferd erhielt durch die Aufteilung der Proben zu jedem der beurteilten Parameter (z.B. Makrophagen oder neutrophile Granulozyten) zwei Ergebnisse von einem Labor (Probe a und b des gleichen Pferdes), die miteinander verglichen wurden.

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 aufwies. Zum einen wurden semiquantitative Angaben, zum anderen Prozentzahlen (quantitative Werte) angegeben. Durch die Befundergebnisse der 30 Pferde konnten für die semiquantitativen Begriffe individuelle Beurteilungsschemata der einzelnen Labore erstellt werden. Mithilfe dieser Beurteilungsschemata konnten die semiquantitativen Begriffe für die statistische Auswertung in kategoriale Daten überführt werden. Die Prozentangaben anderer Labore konnten direkt als metrische Daten zum Vergleich herangezogen werden.

Interindividuelle Varianz

Aufgrund der unterschiedlichen Beurteilungsschemata der Labore (semiquantitative Angaben und Prozentzahlen) konnte ein statistischer Vergleich der zytologischen Ergebnisse zwischen den Laboren (interindividuelle Varianz) nicht stattfinden. Die Problematik der Vergleichbarkeit zytologischer Ergebnisse 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. Dabei wurde versucht

die semiquantitativen Bewertungen und prozentualen Angaben der Labore in einem Schema zu vereinheitlichen. Für die Erstellung wurden die Informationen und Definitionen der einzelnen Labore zusammen mit der klinikinternen Befundung genutzt und eine Vereinheitlichung der Befundungsmöglichkeiten vorgenommen. Um schlussendlich den interindividuellen Vergleich durchzuführen, wurden die Befundergebnisse aller Labore auf das vereinheitlichte Scoring System übertragen. Auf diese Weise wurden kategoriale Daten für einen statistischen Vergleich erzeugt. In Tabelle 2 ist das vereinheitlichte Scoring System dieser Studie für die an der Differenzialzellzählung beteiligten Zellarten nachzuvollziehen.

Die semiquantitativen Angaben der Labore und des Scoring Systems wie z.B. geringgradig, mittelgradig, hochgradig oder dominierend stellten absolute Anteile der Zellart am gesamten Zellbild dar und bedeuteten keine pathologische Vermehrung der Zellart.

Statistik

Für die statistische Auswertung wurde IBM SPSS Statistics genutzt. Als statistische Maße zur Quantifizierung der intra-individuellen Übereinstimmung wurden der Intraklassenkorrelationskoeffizient (ICC) für metrische Daten (Prozentwerte) und das Cohens Kappa und gewichtete Cohens-Kappa für nominal- und ordinalskalierte (kategoriale) Daten (semiquantitative Angaben) berechnet. Zur Beurteilung der Werte wurde sich an den von Koo und Li sowie von Landis und Koch festgelegten Vorschlägen zur Interpretation orientiert^[42,43]. Das gewichtete Cohens-Kappa bietet den Vorteil, dass die Größe des Unterschieds zwischen zwei Werten berücksichtigt wird.

Zur Quantifizierung der interindividuellen Übereinstimmung der Ergebnisse wurde *Krippendorff's α* berechnet. Dieses statistische Maß bietet den Vorteil, dass es für eine beliebige Anzahl an Beurteilern, Ausprägungen sowie ordinale, nominale und metrische Daten verwendet werden kann und nicht durch fehlende Werte beeinflusst wird^[44]. Auch hier wurde sich an den von *Krippendorff* festgelegten Werten zur Interpretation orientiert^[45]. Für jedes berechnete statistische Maß wurde ein 95%-Konfidenzintervall angegeben. Das Konfidenzintervall hängt von der Varianz der Ergebnisse und der Stichprobengröße ab.

Ergebnisse

Durch die gesamthafte Beurteilung der Anamnese, der klinischen, endoskopischen und zytologischen Befunde sowie der arteriellen Blutanalysen konnte in der eigenen Klinik für Pferde der Freien Universität Berlin eine valide Diagnose für alle Studienpferde gestellt werden. Diese Beurteilung stellt den Goldstandard zur Diagnosestellung von equinem Asthma dar, weswegen die Diagnosen aus der Klinik für Pferde als Referenz und als „richtige“ Diagnosen für die Studie genutzt wurden^[4]. Mithilfe des Scoring System von Barton und Gehlen (2022) wurden die untersuchten Pferde in drei Gruppen eingeteilt^[41]. Fünf Pferde waren gesund (Gruppe 1), fünf Pferde waren geringgradig oder mittelgradig an Equinem Asthma erkrankt (MEA: Gruppe 2) und fünf Pferde zeigten ein hochgradiges Equines Asthma (SEA: Gruppe 3)

Intraindividuelle Übereinstimmung – Klinik für Pferde der Freien Universität Berlin

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. 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 (ICC: 0,86). Auch Untersucher B der Klinik für Pferde erreichte eine exzellente intraindividuelle Übereinstimmung der Ergebnisse zu Makrophagen und neutrophilen Granulozyten in der BAL (ICC > 0,9). Eine noch knapp gute Übereinstimmung (ICC: 0,75) erreichte Untersucher A bei den Makrophagen in der BAL. Eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse wurde bei den Lymphozyten in der BAL durch Untersucher B (ICC: 0,88), allerdings nicht mehr durch Untersucher A (ICC: 0,72), erreicht. Die Ergebnisse der eosinophilen Granulozyten variierten bei Untersucher B mehr wodurch nur noch eine moderate Übereinstimmung erreicht werden konnte (ICC 0,62). Unter-

sucher B machte keine Angaben zu den Mastzellen in der BAL. In Abbildung 1 sind die Ergebnisse zu neutrophilen Granulozyten in der BAL von Untersucher B zu allen 15 Pferden dargestellt.

Bei der intraindividuellen Übereinstimmung der Ergebnisse des TBS erreichte Untersucher A dagegen nur bei den neutrophilen Granulozyten (gewichtetes Kappa: 0,63) und Untersucher B allein bei den Makrophagen und neutrophilen Granulozyten (gewichtetes Kappa: 0,7 und 0,64) eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Die Übereinstimmung der Ergebnisse zu allen weiteren Zellarten der Differentialzellzählung war bei beiden Untersuchern moderat oder schlecht (gewichtetes Kappa < 0,6).

Intraindividuelle Übereinstimmung der Fremdlabore

Labor 1 und 2 machten bei den zytologischen Ergebnissen von TBS und BAL ausschließlich semiquantitative Angaben. Beim intraindividuellen Vergleich konnte Labor 1 im TBS eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse zu den neutrophilen Granulozyten (gewichtetes Kappa: 0,69) und in der BAL zu

Tab. 2 Vereinheitlichtes Scoring System zur zytologischen Untersuchung von TBS und BAL | *Unified scoring system for the cytological examination of TBS and BAL.*

Vereinheitlichtes Scoring System für TBS und BAL				
	TBS		BAL	
Alveolarmakrophagen	1	ganz vereinzelt, vereinzelt, <10%	1	ganz vereinzelt, vereinzelt, <10%
	2	wenige, geringgradig, 10–30%	2	wenige, einige, geringgradig, 10–40%
	3	einige, zahlreich, mittelgradig, 30–70%	3	mittelgradig, zahlreich, 40–70%
	4	hochgradig, etliche, >70%	4	hochgradig, etliche, >70%
	5	dominierend, massenhaft, >90%	5	dominierend, massenhaft, >90%
Neutrophile Granulozyten	1	ganz vereinzelt, vereinzelt, <10%	1	ganz vereinzelt, vereinzelt, <5%
	2	wenige, geringgradig, 10–25%	2	geringgradig, <10%
	3	einige, mittelgradig, 25–45%	3	wenige, mittelgradig, 10–25%
	4	hochgradig, zahlreich, 45–70%	4	einige, zahlreich, hochgradig, 25–60%
	5	etliche, massenhaft, dominierend, >70%	5	etliche, massenhaft, dominierend, >60%
Lymphozyten	1	ganz vereinzelt, vereinzelt, <10%	1	ganz vereinzelt, vereinzelt, <10%
	2	wenige, geringgradig, 10–30%	2	wenige, geringgradig, 10–25%
	3	einige, mittelgradig, 30–50%	3	einige, mittelgradig, 25–50%
	4	hochgradig, zahlreich, etliche, >50%	4	hochgradig, zahlreich, etliche, >50%
	5	massenhaft, dominierend, >70%	5	massenhaft, dominierend, >70%
Eosinophile Granulozyten	1	ganz vereinzelt, vereinzelt, <1%	1	ganz vereinzelt, vereinzelt, <1%
	2	wenige, geringgradig, 1–5%	2	wenige, geringgradig, 1–5%
	3	einige, mittelgradig, 5–10%	3	einige, mittelgradig, 5–10%
	4	hochgradig, zahlreich, >10%	4	hochgradig, zahlreich, >10%
Mastzellen	1	ganz vereinzelt, vereinzelt, <1%	1	ganz vereinzelt, vereinzelt, <2%
	2	wenige, geringgradig, 1–5%	2	wenige, geringgradig, 2–5%
	3	einige, mittelgradig, 5–10%	3	einige, mittelgradig, 5–10%
	4	hochgradig, zahlreich, >10%	4	hochgradig, >10%

Mastzellen (gewichtetes Kappa: 0,63) erreichen. In der BAL variierten bei diesem Labor die Ergebnisse zu den Neutrophilen mehr, sodass nur eine moderate Übereinstimmung (gewichtetes Kappa: 0,52) erzielt wurde. Auch Labor 2 erreichte in der BAL und im TBS eine gute Übereinstimmung (gewichtetes Kappa BAL: 0,64; TBS: 0,68) der Ergebnisse zu den neutrophilen Granulozyten. Bei allen weiteren Zellarten der Differentialzellzählung wurde weder im TBS noch in der BAL bei Labor 1 und 2 eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse erzielt (gewichtetes Kappa < 0,4).

Labor 3 und 4 gaben bei den zytologischen Ergebnissen von TBS und BAL ausschließlich Prozentangaben an. Labor 4 gab nur einen Befund an (TBS und/oder BAL). Hier war unklar wie die Befundung von TBS und BAL erfolgte und beurteilt wurde, da es für beides nur einen gemeinsamen Befund gab. Labor 3 zeigte eine gute und exzellente Übereinstimmung der Ergebnisse zu Makrophagen (BAL: ICC: 0,86; TBS ICC: 0,98) und neutrophilen Granulozyten (BAL: ICC: 0,91; TBS: ICC: 0,97) in der BAL und im TBS und zu Mastzellen in der BAL (ICC: 0,88). Auch bei Labor 4 wurde bei den Ergebnissen zu Makrophagen und neutrophilen Granulozyten eine gute Übereinstimmung (ICC: 0,85 und 0,895) erreicht. Die Ergebnisse zu Lymphozyten erreichten bei Labor 3 in der BAL noch fast eine gute Übereinstimmung (ICC: 0,72), allerdings nicht im TBS (ICC: 0,42). Auch Labor 4 konnte bei den Lymphozyten nur eine schlechte Übereinstimmung der Ergebnisse erzielen

(ICC: -0,046). Die nicht genannten Ergebnisse dieser zwei Labore zu eosinophilen Granulozyten und Mastzellen konnten aufgrund fehlender Werte nicht berechnet werden oder waren schlecht.

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

Interindividuelle Übereinstimmung

Zwischen allen 6 Laboren bzw. Untersuchern (4 Fremdlabore und 2 Untersucher) wurde eine gute Übereinstimmung der zytologischen Ergebnisse zu den neutrophilen Granulozyten erreicht (Abb. 2, 3 und 4). 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). Die Ergebnisse zu allen weiteren an der Differentialzellzählung beteiligten Zellarten variierten in der BAL und im TBS dagegen deutlicher, sodass nur eine geringere Übereinstimmung erreicht wurde (Krippendorff's α < 0,67). In den Abbildungen 2, 3 und 4 sind die Mittelwerte

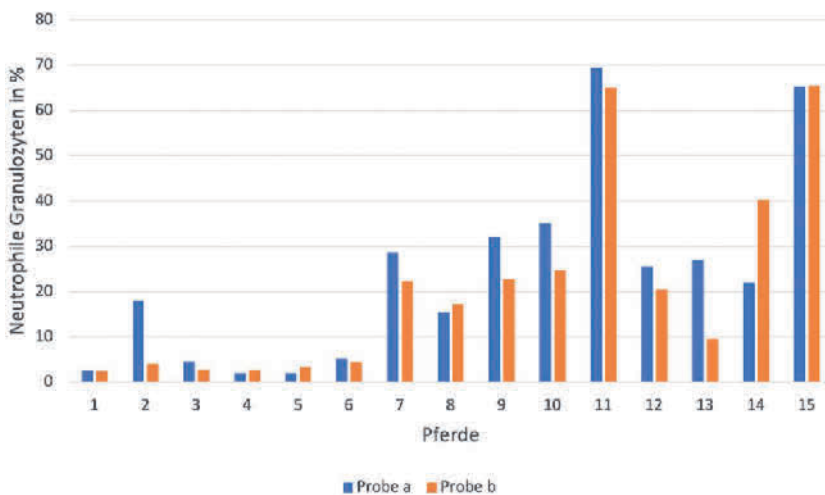


Abb. 1 Intraindividuelle Varianz: Ergebnisse zu neutrophilen Granulozyten in der BAL von Untersucher B zu allen 15 Pferden. | Intra-individual variance: Results on neutrophil granulozytes in the BAL of examiner B for all 15 horses.

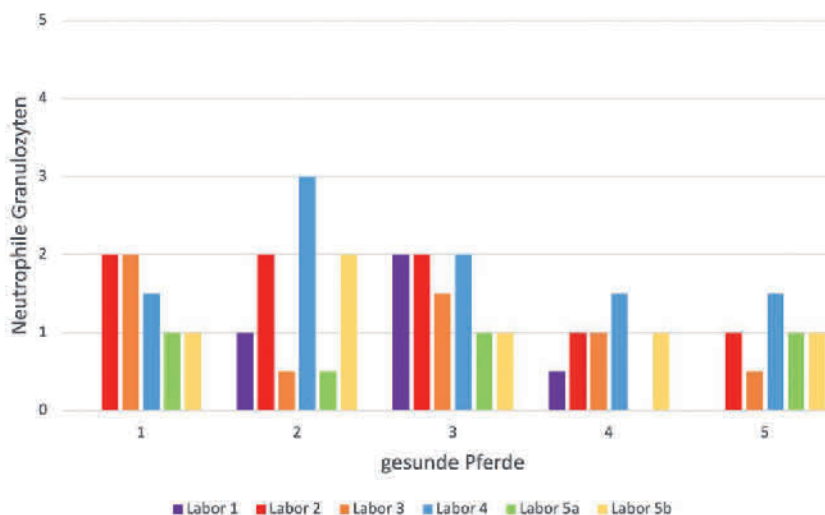


Abb. 2 Interindividueller Vergleich der Ergebnisse zu neutrophilen Granulozyten in der BAL aller Labore und Untersucher zu den lungengesunden Pferden, Zahlenwerte sind durch die Übertragung der Ergebnisse in das vereinheitlichte Scoring System entstanden, Ergebnisse sind die Mittelwerte aus den Proben a und b von jedem Labor. | Interindividual comparison of the results on neutrophil granulozytes in the BAL of all laboratories and examiners to the healthy horses, numerical values were created by transferring the results into the standardized scoring system, results are the average values from samples a and b from each laboratory.

der Ergebnisse aus den Proben a und b aller 4 Fremdlabore und der Untersucher A und B der Klinik für Pferde (Labor 5) zu neutrophilen Granulozyten dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Ergebnisse zwischen allen Laboren und Untersuchern bei den neutrophilen Granulozyten variieren, dennoch ist die Gesamtvarianz der Ergebnisse gering.

Lungengesunde Pferde

Die Untersucher A und B der Klinik für Pferde teilten in der verblindeten Analyse mit wenigen Ausnahmen alle lungengesunden Pferde richtig ein. Bei den Fremdlaboren fiel auf, dass einige Labore bei einer erhöhten Phagozytose der Makrophagen, dem Vorkommen mehrkerniger Zellen, einer Hyper- und Dyskrinie und/oder einer Störung der mukoziliären Clearance trotz der fehlenden neutrophilen Entzündung in der BAL ein MEA vermuteten. Andere ordneten diese Auffälligkeiten einer Störung im Respirationstrakt und einer granulomatösen Entzündung zu.

Pferde mit MEA und SEA

MEA und equines Asthma in Remission wurden bei beiden Untersuchern der Klinik für Pferde bei $< 25\%$ neutrophilen Granulozyten in der BAL diagnostiziert, bei $> 25\%$ neutrophile Granulozyten wurde der Verdacht auf SEA geäußert. Die meisten Fremdlabore stellten generell die Verdachtsdiagnose „equines Asthma“ bei einer neutrophilen bzw. purulenten Entzündung, bei Hinweisen auf eine Dys- und Hyperkrinie, Obstruktionsprozessen und einer Störung der mukoziliären Clearance. Somit wurde bei den erkrankten Pferden meistens

equines Asthma diagnostiziert, allerdings variierte der Schweregrad der Erkrankung zwischen und innerhalb der Labore und Untersucher. Der Großteil der Labore orientierte sich bei der Schwere der Erkrankung an der Anzahl neutrophiler Granulozyten, allerdings konnte besonders bei den semiquantitativen Angaben nicht immer nachvollzogen werden, ab wann eine Differenzierung in MEA und SEA erfolgte. Ein Labor stellte darüber hinaus bei fünf Pferden die Diagnose einer bakteriellen Bronchitis.

Diskussion

Die zytologische Beurteilung von TBS und BAL stellt in der Diagnostik von equinem Asthma einen wichtigen Teil der Atemwegsuntersuchung dar, wobei die endgültige Diagnosestellung und Therapie von der zytologischen Verdachtsdiagnose beeinflusst wird^[4]. 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.

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 zur Anzahl der neutrophili-

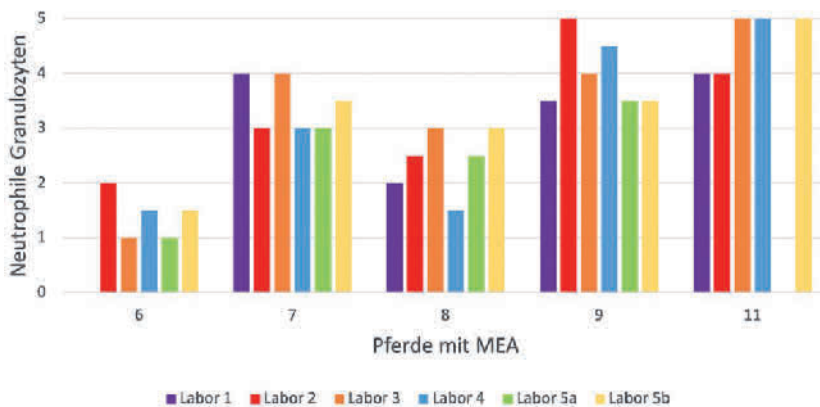


Abb. 3 Interindividueller Vergleich der Ergebnisse zu neutrophilen Granulozyten in der BAL aller Labore und Untersucher zu den Pferden mit MEA, Erklärung Zahlenwerte s. Abb. 2. | *Interindividual comparison of the results on neutrophil granulocytes in the BAL of all laboratories and examiners to the horses with MEA, explanation of numerical values see Fig. 2.*

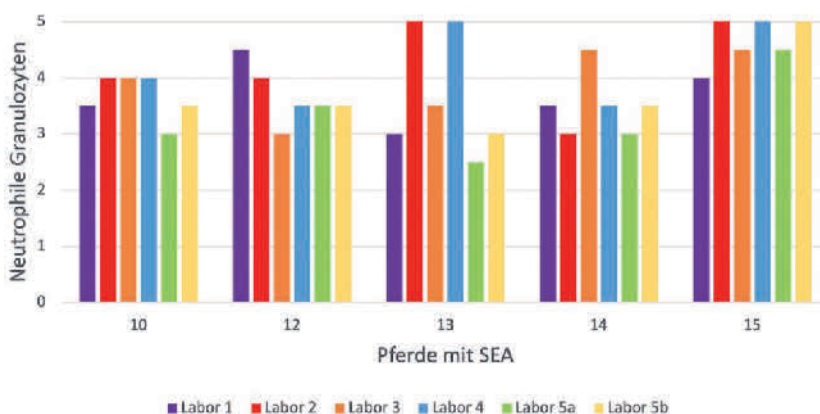


Abb. 4 Interindividueller Vergleich der Ergebnisse zu neutrophilen Granulozyten in der BAL aller Labore und Untersucher zu den Pferden mit SEA, Erklärung Zahlenwerte s. Abb. 2. | *Interindividual comparison of the results on neutrophil granulocytes in the BAL of all laboratories and examiners to the horses with SEA, explanation of numerical values see Fig. 2.*

len 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 semi-quantitativen Angaben anderer Labore resultieren in einer geringeren Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu einigen Zellarten der Differentialzellzählung. Somit hatte die Art und Weise der zytologischen Auswertung Einfluss auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Es konnte 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.

Einige Studien zum Pferd, Hund und auch zum Menschen beschäftigten sich mit der intra- und interindividuellen Reproduzierbarkeit der Differentialzellzählung der BAL vor allem in Bezug auf die Anzahl der gezählten Zellen [3,28,46,47]. Bei den genannten Studien wurden einheitlich Zytopinsausstriche aus BAL-Proben angefertigt und meist durch zwei oder drei verblindete, trainierte Untersucher beurteilt, wobei immer 100–500 Zellen ausgezählt und quantitative Werte (Prozentangaben) zu den Zellarten der Differentialzellzählung angegeben wurden [3,28,46,47]. In diesen Studien wurden gute bzw. akzeptable Übereinstimmungen der Ergebnisse bei neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und zum Teil bei den eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten erreicht (Lin's Konkordanz Koeffizient > 0,9; ICC > 0,85; Kappa Statistik > 0,64) [3,28,46,47]. Weniger gute Übereinstimmungen bei den Lymphozyten, eosinophilen Granulozyten und Mastzellen wurden zum Teil auf eine geringere Anzahl gezählter Zellen sowie auch das geringe Vorkommen dieser Zellarten zurückgeführt [3,46,47]. Insgesamt stimmte die Varianz der Ergebnisse innerhalb der Labore, die in dieser Studie Prozentangaben machten, mit den guten Ergebnissen zur Reproduzierbarkeit aus anderen Studien überein. Dies wird auf die ähnliche zytologische Auswertung zurückgeführt. Folglich 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.

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. Ebenso könnten die Ausstrich-technik und die Färbung der Proben als einzige Parameter der Probenbearbeitung zu Unterschieden in den zytologischen Ergebnissen geführt haben [17,20,27,48]. Vor allem bei viskösen Proben kann es zu einer ungleichmäßigen Zellverteilung auf den Objektträgern gekommen sein.

Die aktuelle Studie basierte auf den laborinternen Protokollen zur zytologischen Untersuchung, sodass manche Labore ebenfalls eine Zellzählung vornahmen und Prozentangaben machten, andere dagegen eine subjektive Schätzung der Menge einer Zellart machten. Die mikroskopische Auswertung kann bereits durch verschiedene untersuchte Bereiche des Objektträgers und eine unterschiedliche Anzahl

der gezählten Zellen Einfluss auf die die Reproduzierbarkeit zytologischer Ergebnisse innerhalb der Labore gehabt haben [25,27,46,49].

Die interindividuelle Übereinstimmung zytologischer Ergebnisse zwischen Laboren in Deutschland war in dieser Studie für die Angaben zu neutrophilen Granulozyten in der BAL und im TBS gut (Krippendorff's α > 0,7). Dies stellt wahrscheinlich die wichtigste Zellart zur Stellung der Verdachtsdiagnose „Equines Asthma“ dar und hat somit direkten Einfluss auf das weitere Management und die Therapie des Pferdes. Ebenso konnte aufgrund der Reproduzierbarkeit der neutrophilen Granulozyten von einer grundsätzlich ähnlichen Zellverteilung auf den Ausstrichen des gleichen Pferdes ausgegangen werden. Dennoch sind weitere Zellarten und Materialien ebenfalls wichtig zur Beurteilung der Krankheitsdauer, -ursache und -pathogenese. Diese Ergebnisse variierten allerdings deutlicher zwischen Laboren in Deutschland.

Eine Laborstudie aus dem humanmedizinischen Bereich zur Zuverlässigkeit der Knochenmarkszytologie bei metastasierendem Neuroblastom konnte keine zuverlässige Quantifizierung der Tumorzellen im Knochenmarksaspirat erreichen (Krippendorff's α 0,325–0,45). Folglich wurde diese Diagnostik in Frage gestellt [50]. Dazu untersuchten sechs bis sieben erfahrene Untersucher aus verschiedenen europäischen Laboren zu drei verschiedenen Zeitpunkten Knochenmarksaspirate. Die Prozentangaben zur Menge von Tumorzellen wurden wie in der aktuellen Studie in Kategorien zur Vergleichbarkeit eingeteilt. Es wurde auf eine nicht ausreichende Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei einer medizinischen Untersuchung hingewiesen [50]. 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.

Eine Limitierung des interindividuellen Vergleichs stellt die nachträgliche Umwandlung der ursprünglichen Befunde in Werte des standardisierten Befundbogens dar.

Eine schwere neutrophile Entzündung der Atemwege wurde in dieser Studie nicht einheitlich zwischen verschiedenen Laboren interpretiert und von einem Labor zum Teil als bakterielle Infektion interpretiert, die eine antibiotische Therapie zur Folge hat.

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. Es kann geschlussfolgert werden, dass eine alleinige Interpretation der zytologischen Befunde zwischen und innerhalb der Labore nur zu mäßig reproduzierbaren (Verdachts)-Diagnosen führt. Ohne einen ausführlichen Vorbericht mit klinischen und endoskopischen Symptomen kann nur schwierig eine valide Verdachtsdiagnose gestellt und eine Unterscheidung zwischen MEA und SEA gemacht werden.

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 deutlich eingeschränkt und kritisch bewertet werden. Die Unterschiede können z.T. auf die variable Auswertung der Proben zurückgeführt werden.

Demnach kann geschlossen werden, dass die zytologische Untersuchung nur zu einem kleinen Teil zur endgültigen Diagnosestellung herangezogen werden sollte und die klinischen Befunde den größten Einfluss auf die Diagnose und damit die weitere Therapie haben sollten. Ohne genaue Angaben der klinischen Befunde und des Vorberichts sind valide zytologische Diagnosen nur eingeschränkt möglich. Das Zusammenspiel aller Befunde sollte als Goldstandard für die Diagnosestellung beim Equinen Asthma gelten.

Fazit für die Praxis

Als Empfehlung sollte für valide zytologische Ergebnisse besonders bei Verlaufsuntersuchungen immer das gleiche Labor für die zytologische Auswertung herangezogen werden. Darüber hinaus besteht der Bedarf 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.

Literatur

- Couetil LL, Hoffman AM, Hodgson J, Buechner-Maxwell V, Viel L, Wood JLN, Lavoie J-P (2007) Inflammatory Airway Disease of Horses. *J Vet Intern Med* 21, 356–361, DOI 10.1111/j.1939-1676.2007.tb02975.x
- Ivester KM, Couetil LL, Moore GE (2018) An observational study of environmental exposures, airway cytology, and performance in racing thoroughbreds. *J Vet Intern Med* 32, 1754–1762, DOI 10.1111/jvim.15226
- Wasko AJ, Barkema HW, 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, DOI 10.1111/j.2042-3306.2010.00150.x
- Couetil LL, Cardwell JM, Gerber V, Lavoie JP, Leguillette R, Richard EA (2016) Inflammatory Airway Disease of Horses--Revised Consensus Statement. *J Vet Intern Med* 30, 503–515, DOI 10.1111/jvim.13824
- Couetil LL, Ward MP (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, DOI 10.2460/javma.2003.223.1645.
- Lavoie JP (2021) How to Diagnose Mild and Moderate Equine Asthma as a Cause of Poor Performance in Sport Horses. *AAEP Proceedings* 67, 199–201
- Couetil L, Cardwell JM, Leguillette R, Mazan M, Richard E, Bienzle D, Bullone M, Gerber V, Ivester K, Lavoie JP, 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
- Leguillette R (2003) Recurrent airway obstruction--heaves. *Vet Clin North Am Equine Pract* 19, 63–86, DOI 10.1016/s0749-0739(02)00067-6
- Costa LRR, Johnson JR, Baur ME, Beadle RE (2006) Temporal clinical exacerbation of summer pasture-associated recurrent airway obstruction and relationship with climate and aeroallergens in horses. *Am J Vet Res* 67, 1635–1642, DOI 10.2460/ajvr.67.9.1635
- Hotchkiss JW, Reid SW, Christley R (2006) Construction and validation of a risk-screening questionnaire for the investigation of recurrent airway obstruction in epidemiological studies of horse populations in Great Britain. *Prev Vet Med* 75, 8–21, DOI 10.1016/j.prevetmed.2006.01.001
- Depecker M, Richard EA, Pitel PH, Fortier G, Leleu C, Courouche-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, DOI 10.1016/j.tvjl.2013.10.013
- Mair TS, Stokes CR, Bourne FJ (1987) Cellular content of secretions obtained by lavage from different levels of the equine respiratory tract. *Equine Vet J* 19, 458–462, DOI 10.1111/j.2042-3306.1987.tb02644.x
- Orard M, Depecker M, Hue E, Pitel PH, Courouche-Malblanc A, Richard EA (2016) Influence of bronchoalveolar lavage volume on cytological profiles and subsequent diagnosis of inflammatory airway disease in horses. *Vet J* 207, 193–195, DOI 10.1016/j.tvjl.2015.09.027
- Pickles K, Pirie RS, Rhind S, Dixon PM, McGorum BC (2002a) Cytological analysis of equine bronchoalveolar lavage fluid. Part 1: Comparison of sequential and pooled aliquots. *Equine Vet J* 34, 288–291, DOI 10.2746/042516402776186137
- Jean D, Vrans 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, DOI 10.2460/ajvr.72.6.838.
- Hewson J, Viel L (2002) Sampling, Microbiology and Cytology of the Respiratory Tract, In: *Equine Respiratory Diseases*, Lekeux P, International Veterinary Information Service, Ithaca NY, B0301.0302, URL: http://www.avis.org/special_books/Lekeux/viel/chapter_frm.asp
- Pickles K, Pirie RS, Rhind S, Dixon PM, McGorum BC (2002b) Cytological analysis of equine bronchoalveolar lavage fluid. Part 2: comparison of smear and cytocentrifuged preparations. *Equine Vet J* 34, 292–296, DOI 10.2746/042516402776186155
- Pickles K, Pirie RS, Rhind S, Dixon PM, McGorum BC (2002c) Cytological analysis of equine bronchoalveolar lavage fluid. Part 3: the effect of time, temperature and fixatives. *Equine Vet J* 34, 297–301, DOI 10.2746/042516402776185967
- Wenisch T, Fey K, Sasse HHL (2001) Zum Einfluss der Präparatstellung und Lagerung auf die absolute Zellzahl und das Differenzialzellbild der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) beim Pferd. *Tierärztliche Praxis* 29, 249–255.
- Hughes KJ, Malikides N, Hodgson DR, Hodgson JL (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, DOI 10.1111/j.1751-0813.2003.tb12538.x
- Leclere M, Desnoyers M, Beauchamp G, Lavoie JP (2006) Comparison of Four Staining Methods for Detection of Mast Cells in Equine Bronchoalveolar Lavage Fluid. *J Vet Intern Med* 20, 377–381, DOI 10.1111/j.1939-1676.2006.tb02871.x
- Nafe LA, DeClue AE, Reinero CR (2011) Storage alters feline bronchoalveolar lavage fluid cytological analysis. *J Feline Med Surg* 13, 94–100, DOI 10.1016/j.jfms.2010.09.017
- Curran M, Boothe DM, Hathcock TL, 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, DOI 10.1111/jvim.15686

- 24 Hoffman AM, Robinson NE, Wade JF (2003) Proceedings of a Workshop on Inflammatory Airway Disease: Defining the Syndrome, Havemeyer Foundation, Boston, USA, R & W Publications (Newmarket) Limited, ISSN 1472–3158
- 25 De Brauwer EI, Jacobs JA, Nieman F, Bruggeman CA, Wagenaar SS, Drent M (2002) Bronchoalveolar lavage fluid differential cell count. How many cells should be counted? *Anal Quant Cytol Histol* 24, 337–341, PMID: 12508692
- 26 Baughman RP (2007) Technical aspects of bronchoalveolar lavage: recommendations for a standard procedure. *Semin Respir Crit Care Med* 28, 475–485, DOI 10.1055/s-2007-991520
- 27 Dehard S, Bernaerts F, Peeters D, Detilleux J, McEntee K, Day MJ, Clercx C (2008) Comparison of Bronchoalveolar Lavage Cytospins and Smears in Dogs and Cats. *J Am Anim Hosp Assoc* 44, 285–294, DOI 10.5326/0440285
- 28 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, DOI 10.1111/j.1939-165X.2009.00160.x
- 29 Zinkl JG (2001) Lower Respiratory Tract, In: Diagnostic Cytology and Hematology of the Horse, Cowell RL, Tyler RD, 2. Auflage, Massachusetts, 73–86
- 30 Bedenice D, Mazan MR, Hoffman AM (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, DOI 10.1111/j.1939-1676.2008.0109.x
- 31 Couetil LL, Denicola DB (1999) Blood gas, plasma lactate and bronchoalveolar lavage cytology analyses in racehorses with respiratory disease. *Equine Vet J Suppl* 31, 77–82, DOI 10.1111/j.2042-3306.1999.tb05193.x
- 32 Barton AK, Venner M, Seemann-Jensen A, Ohnesorge B (2007) Tracheobronchialsekret (TBS) -Analyse und Bronchoalveoläre Lavage (BAL) beim Pferd. *Pferdespiegel* 10, 60–65, DOI 10.1055/s-0029-1233645
- 33 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, DOI 10.21836/pem20090403
- 34 Cian F, Monti P, Durham A (2015) Cytology of the lower respiratory tract in horses: An updated review. *Equine Veterinary Education* 27, 544–553, DOI 10.1111/eve.12376
- 35 Couetil LL, Thompson CA (2020a) Airway Diagnostics: Bronchoalveolar Lavage, Tracheal Wash, and Pleural Fluid. *Vet Clin North Am Equine Pract* 36, 87–103. DOI 10.1016/j.cveq.2019.12.006
- 36 Hoffman AM (2008) Bronchoalveolar lavage: sampling technique and guidelines for cytologic preparation and interpretation. *Vet Clin North Am Equine Pract* 24, 423–435, DOI 10.1016/j.cveq.2008.04.003
- 37 Hare JE, Viel L (1998) Pulmonary Eosinophilia Associated with Increased Airway Responsiveness in Young Racing Horses. *J Vet Intern Med* 12, 163–170, DOI 10.1111/j.1939-1676.1998.tb02112.x
- 38 Pirie RS, Couetil LL, Robinson NE, Lavoie JP (2016) Equine asthma: An appropriate, translational and comprehensible terminology? *Equine Vet J* 48, 403–405, DOI 10.1111/evj.12586
- 39 Richard EA, Fortier GD, Denois J-M, Art T, Lekeux PM, Van Erck E (2009) Influence of subclinical inflammatory airway disease on equine respiratory function evaluated by impulse oscillometry. *Equine Vet J* 41, 384–389, DOI 10.2746/042516409X366121
- 40 Robinson NE (2001) International Workshop on Equine Chronic Airway Disease Michigan State University. *Equine Vet J* 33, 5–19, DOI 10.2746/042516401776767412
- 41 Barton AK, Gehlen H (2022) Equine Asthma – Update on terminology, diagnosis and therapy. *Pferdeheilkunde Equine Medicine* 38, 320–335, DOI 10.21836/pem20220402
- 42 Koo TK, Li MY (2016) A Guideline of Selecting and Reporting Intraclass Correlation Coefficients for Reliability Research. *J Chiropr Med* 15, 155–163, DOI 10.1016/j.jcm.2016.02.012
- 43 Landis JR, Koch GG (1977) The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics* 33, 159–174, DOI 10.2307/2529310
- 44 Hayes AF, Krippendorff K (2007) Answering the Call for a Standard Reliability Measure for Coding Data. *Communication Methods and Measures* 1, 77–89, DOI 10.1080/19312450709336664
- 45 Krippendorff K (2004): Content Analysis: An Introduction to Its Methodology. 2. Auflage, USA, Sage Publications, 241–243
- 46 Hansen S, Fjeldborg J, Hansen AJ, Baptiste KE (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, DOI 10.1111/eve.13112
- 47 Warke TJ, Kamath S, Fitch PS, Brown V, Shields MD, Ennis M (2001) The repeatability of nonbronchoscopic bronchoalveolar lavage differential cell counts. *Eur Respir J* 18, 1009–1012, DOI 10.1183/09031936.01.00203101
- 48 Xaubet A, Moises JA, Agusti C, Martos JA, Picado C (1991) Identification of mast cells in bronchoalveolar lavage fluid, Comparison between different fixation and staining methods. *Allergy* 46, 222–227, DOI 10.1111/j.1398-9995.1991.tb00575.x
- 49 De Brauwer EI, Jacobs JA, Nieman F, Bruggeman CA, Wagenaar SS, Drent M (2000) Cytozentrifugation conditions affecting the differential cell count in bronchoalveolar lavage fluid. *Anal Quant Cytol Histol* 22, 416–422, PMID: 11064819
- 50 Schumacher-Kuckelkorn R, Atra A, Belli ML, den Engelsman G, Fréneaux P, Gauthier A, Heijlaerts-Klever A, Scuderi F, Peris LS, 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/pbc.28819