

Die BAL, eine sinnvolle diagnostische Ergänzung bei Atemwegserkrankungen des Pferdes

Od.

Die BAL – eine sensible ergänzende Untersuchungsmethode bei Atemwegserkrankungen der Pferde

Bei der Untersuchung von Atemwegserkrankungen des Pferdes stehen dem Praktiker mittlerweile etliche ergänzende Untersuchungsmethoden zur Verfügung. Nach Aufnahme eines umfassenden Vorberichtes über Symptomatik, Haltung, Fütterung, Leistungsbereitschaft und einer eingehenden klinischen Untersuchung können weitergehende Untersuchungen wie Bronchoskopie, Röntgen, Ultraschall, Blutgasanalyse, BAL (bronchoalveoläre Lavage), TBS (Tracheobronchialsekret) und Lungenfunktionsprüfungen durchgeführt werden. Einige der genannten Methoden sind jedoch nur mit einem gewissen technischen Aufwand und oft auch nicht im Stall durchführbar. Außerdem können mit einigen Methoden geringgradige Veränderungen nicht dargestellt werden (Mair EVE 2000, 12). Das Erkennen von klinisch manifesten respiratorischen Erkrankungen bereitet in der Regel keine Schwierigkeiten. Subklinische Erkrankungen sind jedoch nicht immer einfach zu erfassen und machen Spezialuntersuchungen wie Bronchoskopie und BAL notwendig. (Stämpfli, Boehringer Dialog 2000) Die bronchoalveoläre Lavage (BAL) ist eine leicht durchzuführende, ergänzende und sensible Untersuchungsmethode (Hoffmann, EVE 1999, 11,6) und kann sowohl in der Klinik als auch im Stall entnommen werden. Sie kann blind oder unter endoskopischer Sichtkontrolle durchgeführt werden.

Die BAL ermöglicht die Gewinnung einer Zellpopulation, die insbesondere aus kleinen Bronchien und Alveolen stammt. Sie liefert einen Überblick über den Status der betroffenen Gewebe und kann damit als sensible Methode zur Erfassung von entzündlichen Veränderungen an den Schleimhäuten der kleinen Atemwege und eingeschränkt auch der Alveolen bewertet werden.

Technik der BAL

Die Entnahme sollte mit einem speziellen BAL-Katheter (z.B. Fa. Cook) erfolgen. Der BAL-Katheter besteht aus Silikon und hat einen Durchmesser von 10 mm. Ein an seiner Spitze lokalisierter, aufblasbarer Ballon sorgt dafür, dass die instillierte Flüssigkeit nicht zurückfließen kann. Ein aufgesetzter Dreiwegehahn ermöglicht ein leichtes Instillieren und Aspirieren der Kochsalzlösung. Es ist wichtig, dass das Pferd für die BAL-Entnahme gut fixiert ist. Eine Sedation ist auf jeden Fall empfehlenswert. Einige Autoren verwenden bei Pferden mit stark reaktiven Luftwegen Bronchodilatoren (Clenbuterol 0,8 Mikrog./kg i.v. oder p.o., Albuterol als Aerosol (450 Mikrog.) oder Aminophyllin 1mg/kg verdünnt in 500ml 0,9% NaCl), um eine Bronchokonstriktion zu vermeiden (Stämpfli und Hoffmann). Um Unruhe und Husten auszuschalten wird eine Lidocainlösung instilliert (150ml, 0,5%, auf 37°C erwärmt). Unter

endoskopischer Sichtkontrolle wird diese über einen Katheter im Arbeitskanal beim Einführen des Endoskopes gespritzt. Je nach Verhalten des Pferdes und nach Bedarf kann dies schon beim Passieren der oberen Atemwege erfolgen. Die Carina und auch tiefere Bronchienaufzweigungen werden auf jeden Fall damit besprüht. Bei blindem Einführen des BAL-Katheters wird die Lidocainlösung direkt über den Katheter versprüht. Trotz Sedation und Einsatzes von Lidocain ist bei einigen Pferden die Anwendung einer Nasenbremse notwendig. Der BAL-Katheter wird über den unteren Nasengang eingeführt bis der Kelchkopf erreicht ist. Der Kopf sollte in eine gestreckte Position gebracht werden, so dass der Katheter leicht in die Trachea gleiten kann. Bei Einsatz eines Endoskopes erfordert es manchmal etwas Geduld, den BAL-Katheter am Endoskop vorbei in die Trachea vorzuschieben, besonders bei kleineren Pferden. Ein nicht feststellbarer Widerstand, das Fehlen von Schluckbewegungen und das Aspirieren von Luft bestätigen den richtigen Sitz des Katheters in der Trachea (Hoffmann xxxx). Da der Katheter aus Silikon und damit biegsam ist, muß man darauf achten, dass er sich nicht im Nasopharynx aufrollt. Die Pferde reagieren in einem solchen Fall mit Unruhe und Husten. Aber auch beim richtigen Sitz des Katheters in der Luftröhre können einige Pferde heftige Hustenstöße auftreten. Dabei kann sich der Katheter umbiegen und wird dadurch in die Maulhöhle hochgehustet. In der Regel endet es damit, dass das Pferd das Katheterende völlig zerkaut. Es lohnt sich also, in solch einem Fall lieber den Katheter schnell zu entfernen, das Pferd sich einen Augenblick beruhigen zu lassen und dann neu zu beginnen. Der Katheter wird nach der Passage der Trachea sachte weiter in die Bronchien vorgeschoben, bis man einen leichten Widerstand spürt. Jetzt wird der Ballon mit einer 10ml Spritze mit Luft aufgeblasen, um den sicheren Sitz des Katheters zu gewährleisten und ein Zurückfließen der Flüssigkeit zu vermeiden. Am Kopf wird der Katheter gegen das Nasenseptum gedrückt, um auch hier einen sicheren Sitz zu erreichen. Anschließend können 500ml einer auf 37°C vorgewärmten sterilen NaCl-Lösung mittels eines Infusionsbesteckes an den Dreiwegehahn angeschlossen werden. Ein Doppelgebläse wird mittels aufgesetzter Braunüle in die Kochsalzflasche gesteckt. Danach werden zunächst 200-250ml Kochsalzlösung mit leichtem Druck instilliert. Die Kochsalzlösung kann auch mittels vorbereiteter 50ml Spritzen instilliert werden. Diese werden dann auch zur Aspiration genutzt. Die Rückgewinnung muß vorsichtig erfolgen, um keinen zu hohen Unterdruck entstehen zu lassen. Dieser könnte zu einem Kollaps des Bronchus und zu mechanischen Reizungen der Bronchialschleimhaut führen (Stämpfli, Hoffmann xxx). Bei der beschriebenen Vorgehensweise lassen sich als Minimum etwa 50-70ml der Spülflüssigkeit zurückgewinnen. In der Regel erhält man sogar 60-80% der instillierten Flüssigkeit zurück. Unter Klinikbedingungen werden zur Erhöhung der Zellausbeute meist zweimal ca. 250ml instilliert und wie beschrieben rückgewonnen. Beide Chargen werden anschließend gemischt,

in 5-10ml große Röhren abgefüllt und zentrifugiert (10 min bei 600 - 800 g). Nach der Zentrifugation wird der Überstand vorsichtig abgekippt (dekantiert), das Sediment resuspendiert, auf drei bis vier Objektträger aufgebracht (pro Präparat etwa 0,2ml; entspricht einem großen Tropfen) und jeweils über die gesamte Objektträgerfläche ausgestrichen. Dafür werden am besten Objektträger mit seitlichem Mattschliff verwendet, da man diese einfach mit einem Bleistift auch Färbungsstabil beschriften kann. Anschließend müssen die Präparate, insbesondere wenn sie in Transportcontainern verschickt werden sollen, vollständig an der Luft getrocknet werden. Zur Beschleunigung der Trocknung kann dabei ein Fön eingesetzt werden. Die Anreicherung, d.h. eine Zentrifugation der BAL vor dem Ausstreichen ist zwingend erforderlich. Direkt ausgestrichene BAL-Präparate enthalten fast immer zu wenig Zellen und eignen sich deshalb nicht für eine Auswertung. Bei einer BAL-Entnahme unter Klinikbedingungen sollte angestrebt werden, die Nachbearbeitung des Material bis zur Präparatherstellung in etwa einer Stunde abzuschließen. Der Angabe von Pickles (WEAS 2001), dass eine bei Raumtemperatur gelagerte BAL-Flüssigkeit innerhalb von 8 Std. bearbeitet werden kann, soll an dieser Stelle aufgrund langjähriger Erfahrungen ausdrücklich widersprochen werden. Besonders in stark leukozytenhaltigen Proben kommt es sehr schnell zu einer Freisetzung lysosomaler Enzyme und damit zu einer Selbstverdauung der Zellen und auch zu einer Degradation der Entzündungs- und Schleimanteile. Wenn ausnahmsweise die weitere Bearbeitung der Lavage erst später durchgeführt werden kann, muß die Probe im Kühlschrank aufbewahrt werden. Bei Lagerung der Lavageprobe bis zum nächsten Tag kommt es auch bei einer Temperatur von +4°C zu einer bereits deutlichen Schädigung der Zellen die dazu führt, dass beim Zentrifugieren und beim Ausstreichen ein großer Teil der Zellen stark beschädigt wird. Eine im Feld entnommene Probe sollte immer schnellstmöglich zur weiteren Verarbeitung in die Praxis gebracht werden. Eine Transport in einem mit Eis bestückten Isoliergefaß ist dabei die beste Lösung. Da es bei einer BAL-Entnahme zu Gewebsreaktionen kommen kann, sollte eine Wiederholung nicht vor Ablauf einer Woche durchgeführt werden (Deegen, Boehringer Dialog 2000).

Die Erfahrungen bei der Auswertung von BAL-Proben haben gezeigt, dass die BAL-Beurteilungen am besten von Zytologen oder Pathologen durchgeführt werden. Der Grund dafür ist, dass für die Zellerkennung und die Beurteilung der komplexen Schleimhautreaktionen umfangreiche Spezialkenntnisse und Erfahrungen auf dem Gebiet der Bronchial- und Lungenzytologie erforderlich sind. Dies schließt prinzipiell eine Beurteilung solcher Präparate durch in der Pferdepraxis tätige Kolleginnen und Kollegen nicht aus. Wer sich aber auf dieses Feld begibt sollte wissen, dass eine lange und meist auch mühselige Einarbeitungszeit erforderlich ist, bevor aus einem "Nichtzytologen" ein "BAL-Diagnostiker" wird. Meist scheitert die Qualifizierung daran, dass Proben in

Kliniken oder Praxen nicht kontinuierlich und in ausreichender Anzahl zur Verfügung stehen und Vergleiche, d.h. Präparate mit Standardkrankheitsbildern fehlen.

Für die zytologische Auswertung von BAL-Proben sind aus der Sicht des Zytologen in erster Linie ein ausreichender Zellgehalt und die morphologische Unversehrtheit der ausgestrichenen Zellen die wichtigsten Voraussetzungen. Wenn diese erfüllt sind, können die in der Lavage enthaltenen Zellen allein durch Anwendung zytologischer Beurteilungskriterien zu etwa 80–90% differenziert und damit auch zytogenetisch zugeordnet werden.

Anhand der erhobenen Befunde sind weitreichende Aussagen über die im bronchioalveolären Raum ablaufenden Zell- und Gewebsveränderungen möglich. Sie liefern bei den meisten Krankheitsbildern außerdem Hinweise für die einzuleitenden Behandlungsmaßnahmen. Die BAL-Zytologie wird deshalb beim Pferd zunehmend bei der Diagnostik respiratorischer Erkrankungen eingesetzt. Es soll aber nicht verschwiegen werden, dass bei der Entnahme einer BAL, insbesondere aber bei der Nachbearbeitung des Probenmaterials Fehler auftreten können, die die Auswertung beeinträchtigen oder sogar verhindern.

Insbesondere wenn mit BAL Entnahmen begonnen wird und Erfahrungen bei den Klinik- bzw. Praxismitarbeitern noch nicht vorliegen, treten solche Fehler gehäuft auf. Wir raten deshalb, dass insbesondere in der Anfangszeit sich diejenigen Kollegen, die für die Entnahme verantwortlich sind, mit den Zytologen direkt in Verbindung setzen um auftretende Mängel zu besprechen.

Dadurch gelingt es meist schnell die vorhandenen Fehler auszumerzen.

Die bei einem nicht unerheblichen Teil der zur Untersuchung übersandten Präparate trotzdem auftretenden Mängel entstehen in erster Linie dadurch, dass Anweisungen oder Arbeitsschritte nicht eingehalten oder in abweichender Form durchgeführt werden. Nachstehend werden deshalb die am häufigsten auftretenden Fehler kurz zusammengefasst besprochen :

1.) *Die Zellen auf den Ausstrichen sind stark beschädigt (Zytolyse), außerdem ist eine erhebliche Vermehrung bakterieller Erreger eingetreten.*

Die Spülflüssigkeit wurde bei zu hohen Temperaturen, d.h. bei Raumtemperatur oder im warmen Auto längere Zeit gelagert bzw. transportiert. Insbesondere bei ungekühltem Probentransport im Auto, bei der die Probenflüssigkeit außerdem bewegt wird, entstehen Zellschäden. Lavage-Material sollte deshalb, wenn die Standzeit mehr als eine Stunde beträgt, immer im Kühlschrank gelagert bzw. in Thermogefäßen im Auto transportiert werden.

2.) *Auf den Ausstrichen befinden sich kaum Zellen.*

Lavage-Flüssigkeit wurde ohne vorherige Anreicherung direkt ausgestrichen. Nur wenn durch Zentrifugation eine Volumeneinengung von etwa 1: 50 oder noch stärker erreicht wird, enthalten die Ausstriche genügend Zellen.

Aber auch bei zentrifugierten Proben sind häufig sehr wenig Zellen nachzuweisen. Dafür sind in erster Linie zwei Fehler verantwortlich.

a) Wenn die BAL bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank längere Zeit aufbewahrt wird, kommt es bereits zu einer spontanen Sedimentation der Zellen. Schon nach etwa 20 Minuten sind in einer wässrigen Salzlösung der größte Teil der Zellen auf den Boden abgesunken. Deshalb muß vor Abfüllung der Zellsuspension in die Zentrifugenröhrchen das Vorratsgefäß vorsichtig geschüttelt oder der Inhalt mit der Pipette gerührt werden. Ein großer Anteil von Präparaten mit zu niedrigem Zellgehalt entsteht dadurch, das für die Zentrifugation allein oberflächennahe Flüssigkeitsmengen mit der Pipette abgesaugt werden, die kaum noch Zellen enthalten.

b) Ein ähnlicher Fehler kann auftreten, wenn die gewählte Umdrehungszahl oder die Zentrifugationszeit nicht eingehalten werden. Besonders Proben mit schleimig-viskösen Sekretverdichtungen zeigen eine verzögerte Sedimentation. Das dadurch lockere Bodensediment wird beim Abgießen des Überstandes leicht mit entfernt, d.h. die Zellen befinden sich danach nicht mehr am Röhrchenboden sondern sind im Abfallgefäß bzw. im Ausguß gelandet. Jedes Klinik-oder Praxislabor sollte deshalb mit geeignetem Übungsmaterial diese Präparationsschritte einüben bevor diagnostisch relevantes Material bearbeitet wird.

c) Die Unsicherheit beim Dekantieren führt dazu, dass versucht wird den Überstand mit der Pipette abzusaugen. Dabei wird das Sediment zumindest zu großen Anteilen aufgewirbelt, sodass die Zellen bei dieser Methode ebenfalls verloren gehen.

Für eine ausreichende Anreicherung der Zellen ist deshalb die Einhaltung der angegebenen Zentrifugationsbedingungen besonders wichtig. Nur bei einem ausreichend verdichtetem Sediment kann der Überstand ohne Materialverlust dekantiert werden. Zum Resuspendieren reichen dabei meist die an der inneren Röhrchenwand haftenden Flüssigkeitsmengen. Wenn die Zentrifugenröhrchen nach dem Dekantieren wieder senkrecht gestellt werden, kann so das Zellmaterial am Boden einfach resuspendiert werden. Bei solchem Vorgehen können leicht Volumeneinengungen von 1 . 50 bis sogar 1 . 100 erreicht werden.

3.) *Fehler beim Herstellen und beim Versand der Ausstriche.*

Die resuspendierte Zellsuspension sollte mit einer Pipette oder mit einem Röhrchen auf die Objektträger übertragen werden. Der häufigste Fehler dabei ist, dass das Probenmaterial in zu großer Menge aufgetragen wird. Für gute zytologische Präparate muß die Zellsuspension in dünner Schicht eintrocknen. Nur so spreizen sich die Zellen beim Trocknen ausreichend, so daß sie nach dem Anfärben eine dünne Schicht bilden, in der Kern- und auch Zytoplasmastrukturen gut erkennbar sind. Bei größerer Schichtdicke bleiben die Zellen meist kugelförmig und färben sich dadurch mit den verwendeten Farbstoffen sehr viel stärker an. Sie sind deshalb nur als überfärbte Farbstoffhaufen erkennbar. Deshalb muß die Zellsuspension, auch wenn sich darin visköse oder flockige

Verdichtungen befinden, wie ein Blutausschlag über die gesamte Präparatfläche ausgestrichen werden. Für die anschließende Lufttrocknung kann zur Zeiterparnis ein Fön verwendet werden. Für die Qualität der Zelldarstellung ist auch das zügige Trocknen der Präparate wichtig, da bei langsamem Wasserverlust sich noch Veränderungen der Zellmorphologie ausbilden, die eine Differenzierung erschweren können. Insbesondere bei hoher Luftfeuchtigkeit sollte die Trocknung deshalb entweder mit einem Fön oder im Brutschrank durchgeführt werden. Bei längerer Zeit feuchten Präparate fallen außerdem die Färbungen deutlich schlechter aus. Außerdem besteht bei feucht bleibenden Präparaten die Gefahr, dass sich vorhandene Bakterien weiter vermehren.

Dieses Problem ist insbesondere beim Versand von Ausstrichen von großer Bedeutung. Wenn die Ausstriche in noch feuchtem Zustand in die gut schließenden Transportcontainer verbracht werden, wird die weitere Trocknung unterbrochen. Während des meist ein- oder zweitägigen Transportes vermehren sich die zunächst wenigen Bakterien so stark, dass die gesamten Ausstrichflächen überwuchert werden, d.h. nach Beendigung des Transportes mit zusammenhängenden Bakterienkolonien bedeckt sind. Die von den Erregern abgegebenen Enzyme verursachen dabei eine lytische Beschädigung der Zellstrukturen oder führen sogar im Zentrum der Kolonien zur vollständigen Auflösung. Deshalb ist wichtig, dass nur vollständig getrocknete Präparate versandt werden. Mit dieser einfachen Maßnahme kann die Bakterienvermehrung sicher unterbunden werden.

Beim Versenden von Ausstrichen sollte außerdem beachtet werden, dass die benutzten Transportcontainer gut verschlossen werden. Rausgerutschte Objektträger werden auf den automatischen Sortierstraßen der Post fast immer zerstört. Auch ein Versand in Papier eingewickelter Präparate führt fast immer zum totalen Glasbruch. Weiterhin zeigen Erfahrungen, dass Transportcontainer die in Papierbriefumschlägen versandt werden, durch die Rollen auf den Transport- und Sortiereinrichtungen fast immer aus den Umschlägen herausgedrückt werden. Für den Versand von Proben sollten deshalb ausschließlich die eingeführten Kunststoffbeutel Verwendung finden.

Wenn aus technischen Gründen eine Anreicherung der Zellen in der Lavage durch Zentrifugation nicht möglich sein sollte, kann ausnahmsweise ein Teil der zurückgewonnenen Spülflüssigkeit an das Untersuchungslabor auch direkt versandt werden. Dafür sind etwa 50 ml von der vorhandenen Lavage ausreichend (beim Abfüllen vorher schütteln!). Auch 10ml reichen notfalls aus. Die Zellsuspension sollte dabei aber nicht nativ sondern in konserviertem Zustand versandt werden. In unfixiertem Zustand kommt es insbesondere bei hohen Außentemperaturen zu der bereits besprochenen mehr oder weniger vollständigen enzymatischen Auflösung der Zellen und zur bakteriellen Überwucherung. Eine ausreichende Konservierung der Zellen und eine

Unterdrückung der Bakterienwachstums erreicht man schon durch Zugabe von wenig Formalin-Lösung (Volumenanteil etwa 1 : 20 bei Verwendung einer 5 – 10%igen Formalinlösung). Höhere Formalinzusätze führen dagegen zu starken Qualitätseinbußen bei den gängigen panoptischen Färbungen.

Ausnahmsweise kann auch Tracheobronchiales Sekret (TBS) für eine zytologische Untersuchung verwendet werden. Eine solche Situation besteht z.B. wenn die für die Entnahme notwendigen Geräte oder die Zentrifuge nicht vorhanden oder defekt sind bzw. Spülpuffer aufgebraucht ist.

Die Untersuchung von TBS hat den Nachteil, dass darin überwiegend etwas ältere, d.h. vor etwas längerer Zeit aus den Schleimhäuten ausgetretene Zellen enthalten sind. Da aber mit dem Sekretstrom, d.h. durch die Kinizilität des respiratorischen Epithels ständig Zellen sowohl aus den Alveolen als auch von kleinen Bronchien bis in die Trachea transportiert werden, erhält man auch bei der Untersuchung einer solchen Sekretprobe ebenfalls eine repräsentative Auswahl der im bronchioalveolären Raum vorkommenden Zellen. Die TBS-Proben haben sogar den Vorteil, dass insbesondere die in terminalen Bronchien und Alveolen desquamierten Zellen und auch ausgetretene Sekretbestandteile wie Fibrin oder kondensierte Schleimprodukte ihren topographischen Zusammenhalt weitgehend beibehalten. Dies bedeutet, dass insbesondere Verlegungen in kleinen Bronchien durch Entzündungsprodukte, verdichtete Schleimsubstanzen oder flächig desquamierte Epithelien besser erkennbar sind. Bei der BAL werden dagegen die nichtzellulären Entzündungsprodukte in der Spüllösung feinverteilt suspendiert oder gelöst. Sie entziehen sich damit einer mikroskopischen Beurteilung. Aufgrund der dargestellten Situation sind bereits mehrere größere Kliniken dazu übergegangen, neben den Sedimentausstrichen von der BAL zusätzlich jeweils ein oder zwei TBS-Ausstriche anzufertigen und zu übersenden. Der Untersucher hat dann für die Beurteilung der repräsentativen Zellstichprobe aus den tieferen Atemwegen die BAL-Präparate zur Verfügung. Die kondensierten Sekretanteile, insbesondere eiterflockenartige Zusammenlagerungen aus Fibrin und Leukozyten und verdichtete Schleimprodukte, die insbesondere bei chronischen Bronchitisformen vermehrt vorkommen und vorrangig für die Verlegung gerade der kleinen Atemwege verantwortlich sind, können dagegen an den TBS-Präparaten beurteilt werden.

Die BAL- und eingeschränkt auch die TBS-Diagnostik hat gegenüber anderen Untersuchungsmethoden (transtracheal, tracheobronchial) den Vorteil, dass sie recht gut standardisierbar sind. Entzündungs- und Immunzellen werden sehr sensitiv und spezifisch erfasst und dargestellt. Die einzelnen Entzündungsformen (z.B. akut, subakut oder bereits chronisch; Fibrin- und Schleimgehalt

des Sekretes) können differenziert beurteilt werden und ermöglichen gezielte Hinweise für die einzuleitende Therapien. Besonders die Menge und der Funktionszustand der im Sekret vorkommenden Immunzellen und Makrophagen sowie die Regenerationsintensität des Epithels in terminalen Bronchie und Alveolen ermöglichen Rückschlüsse über Krankheitsstadien gerade bei COB Patienten. Ein weiteres wichtiges Anwendungsgebiet sind Ankaufsunter-suchungen. Hier ist die Zellanalyse eine wichtige Grundlage mit der latente oder chronische respiratorische Erkrankungen sicherer erfasst werden können..