

EINSATZ DER EXFOLIATIVEN ENDOMETRIUMSZYTOLOGIE BEI ZUCHTSTUTEN UNTER PRAXISBEDINGUNGEN. VERGLEICH VON VERSCHIEDENEN ENTNAHMEMETHODEN

KLAUS-PETER NEUBERG

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



edition wissenschaft
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

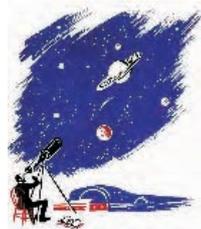
Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin, Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie
und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. A. Wehrend

**EINSATZ DER EXFOLIATIVEN ENDOMETRIUMSZYTOLOGIE BEI
ZUCHTSTUTEN UNTER PRAXISBEDINGUNGEN. VERGLEICH VON
VERSCHIEDENEN ENTNAHMEMETHODEN**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Klaus-Peter Neuberg

Tierarzt aus Lüneburg (Niedersachsen)

Gießen 2009

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter: Prof. Dr. A. Wehrend

Prof. Dr. R. Brehm

Tag der Disputation: 24.8.2009

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Fragestellung.....	1
2	Literatur.....	2
2.1	Endometritis bei der Stute	2
2.1.1	Definition, Bedeutung und Einteilungsformen	2
2.1.2	Infektiöse Ursachen einer Endometritis	3
2.1.3	Nichtinfektiöse Ursachen der Endometritis	8
2.2	Indikation der exfoliativen Endometriumszytologie bei der Stute.....	11
2.3	Technik und Durchführung der exfoliativen Endometriumszytologie bei der Stute	17
2.3.1	Entnahmezeitpunkt	17
2.3.2	Entnahmetechnik	18
2.3.3	Probenaufbereitung	23
2.4	Interpretation der exfoliativen Endometriumszytologie bei der Stute.....	24
2.4.1	Mikroskopische Untersuchung.....	24
2.4.2	Endometriumszellen	25
2.4.3	Neutrophile Granulozyten	29
2.4.4	Andere Zelltypen.....	34
3	Material und Methode	36
3.1	Probanden.....	36
3.2	Versuchsgruppen	37

Inhaltsverzeichnis

3.2.1	Versuch A: Vergleich des bakteriologischen Befundes mit dem zytologischen Befund.....	37
3.2.2	Versuch B: Vergleich dreier Zytologie-Entnahmesysteme	38
3.3	Untersuchungsverfahren	39
3.3.1	Gynäkologische Untersuchung	39
3.3.2	Trächtigkeitsuntersuchung	41
3.3.3	Entnahmetechnik für die bakteriologische Untersuchung	42
3.3.4	Entnahmetechnik für die zytologische Untersuchung	43
3.4	Auswertung	46
3.4.1	Auswertung der bakteriologischen Untersuchung.....	46
3.4.2	Lichtmikroskopische Auswertung der exfoliativen Endometriumszytologien.....	48
3.5	Statistische Methoden	50
4	Ergebnisse	52
4.1	Angaben zum Stutenkollektiv und der gynäkologischen Untersuchung	52
4.2	Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung der Uterustupferproben..	53
4.3	Ergebnisse der exfoliativen Endometriumszytologien	71
4.3.1	Zelldifferenzierung	71
4.3.2	Zytologische Parameter im Entnahmesystemvergleich	74
4.3.3	Paarvergleich der Entnahmesysteme	79
4.4	Zusammenhang zwischen zytologischer Untersuchung und Daten aus Anamnese und gynäkologischer Untersuchung	91

4.5	Zusammenhang zwischen bakteriologischer und zytologischer Untersuchung	101
4.5.1	Verhältnis der zytologischen zu den bakteriologischen Befunden	101
4.5.2	Verhältnis des zytologischen zum bakteriologischem Befund bei den fakultativ pathogenen Keimen unter Berücksichtigung des Nachweises in Reinkultur oder Mischkultur (Entnahme der Zytologien mit dem CytologyBrush®).....	105
4.5.3	Vergleich des Anteils zytologisch positiver Proben zwischen den verschiedenen Keimarten	108
4.5.4	Zusammenhang zwischen dem Neutrophilen-Index in den exfoliativen Endometriumszytologien und der Stärke des Keimgehaltes in der bakteriologischen Untersuchung.....	109
4.6	Einflussfaktoren auf das Trächtigkeitsergebnis	111
5	Diskussion.....	118
5.1	Diskussion der Fragestellung	118
5.2	Diskussion der Methodik	118
5.3	Bakteriologische Untersuchung.....	124
5.4	Zytologische Untersuchungen	127
5.4.1	Zytologische Parameter im Entnahmesystemvergleich	127
5.4.2	Paarvergleich der Entnahmesysteme	130
5.5	Zusammenhang zwischen zytologischen Ergebnissen und anamnestischen Daten.....	133
5.6	Zusammenhang zwischen bakteriologischer und zytologischer Untersuchung	136
5.7	Einflussfaktoren auf das Trächtigkeitsergebnis	140

Inhaltsverzeichnis

5.8	Schlussbetrachtung und Fazit für die Praxis	144
6	Zusammenfassung.....	146
7	Summary.....	149
8	Literaturverzeichnis.....	152

1 Einleitung und Fragestellung

Die exfoliative Endometriumszytologie wurde von Knudsen (1964) als diagnostisches Verfahren in die gynäkologische Untersuchung der Stute eingeführt. Durch den Nachweis polymorphkerniger Granulozyten im Ausstrich lassen sich unabhängig vom Kultivierungsergebnis von Tupferproben der Gebärmutter entzündliche Reaktionen des Endometriums nachweisen. In der Praxis existieren verschiedene Entnahmesysteme für die intrauterine Probengewinnung. Ziel der vorliegenden Untersuchung war es folgende Fragen zu beantworten:

- Inwiefern unterscheiden sich drei kommerziell erhältliche Systeme zur Gewinnung von Uteruszytologien bei der Stute hinsichtlich der Anzahl auswertbarer Proben und dem Nachweis polymorphkerniger Granulozyten?
- Welche Bakterien werden am häufigsten im Uterus der Stute nachgewiesen?
- Existiert ein Zusammenhang zwischen dem Nachweis fakultativ pathogener Keime in der bakteriologischen Untersuchung und dem Nachweis polymorphkerniger Granulozyten in der exfoliativen Endometriumszytologie bei Zuchtstuten?
- Gibt es eine Korrelation zwischen der Stärke des Keimgehaltes und dem Nachweis polymorphkerniger Granulozyten?
- Zeigt sich ein Zusammenhang zwischen Informationen aus der Anamnese und Befunden der gynäkologischen Untersuchung zu den Ergebnissen der bakteriologischen und zytologischen Untersuchung?
- Gibt es einen Zusammenhang zwischen den Ergebnissen der bakteriologischen und zytologischen Untersuchung zur Trächtigkeitsrate?

2 Literatur

2.1 Endometritis bei der Stute

2.1.1 Definition, Bedeutung und Einteilungsformen

Der Begriff Endometritis ist die Bezeichnung für eine entzündliche Affektion der Gebärmutter Schleimhaut (Emmert, 2000). Es handelt sich hierbei um einen sehr weit gefassten Begriff, der von Schoon und Schoon (1995) folgendermaßen definiert wird:

„Als Endometritis werden alle entzündlichen Prozesse bezeichnet, die hinsichtlich Qualität und Quantität über die physiologischen zyklischen Clearanceprozesse des Endometriums hinausgehen, unabhängig von ihrer Ätiologie.“

Die Endometritis gilt als die bedeutenste Erkrankung des Genitaltraktes bei der Stute (Troedsson, 1997). Eine Befragung an 1149 Pferde-Tierärzten in den USA ergab, dass diese Erkrankung der dritthäufigste Grund ist, weshalb adulte Pferde einem Tierarzt vorgestellt werden (Traub-Dargatz et al., 1991). Bedingt durch die große Variation dieses Krankheitsbildes hinsichtlich Ätiologie, Pathophysiologie, Art der Infektion und Entzündungsprodukten ist eine Klassifikation schwierig. Hurtgen (2006) schlägt die in Tabelle 1 aufgeführte Einteilung vor.

Tabelle 1: Einteilung entzündlicher Veränderungen im Uterus nach Hurtgen (2006)

Einteilungskriterium	Einteilung
Dauer	Akut Subklinisch Chronisch Persistent
Zeitpunkt des Auftretens	Maidenstute Belegungs-induziert Post partum
Ursache	Bakterien Viren Pilze

Unterschieden wird grundsätzlich zwischen einer akuten, transienten und einer chronischen Form (Hughes und Loy, 1969). Die akute Form kann eine Stute in der Regel mittels der körpereigenen Abwehrmechanismen überwinden, gegebenenfalls unterstützt durch eine lokale Antibiotika-Applikation (Liu, 1988). Die chronische Form hingegen ist durch eine persistierende Infektion gekennzeichnet, gegen die auch die Verabreichung von Antibiotika meist keine Wirkung zeigt (Liu, 1988).

Im internationalen Sprachgebrauch hat sich folgende Unterteilung der (persistierenden) Endometritiden durchgesetzt (Troedsson 1999; Watson, 2000):

- sexuell übertragene Krankheiten
- chronisch infektiöse Endometritis
- persistent-breeding-induced-endometritis
- chronisch degenerative Endometritis = Endometrose

2.1.2 Infektiöse Ursachen einer Endometritis

Ein häufiger Grund für Endometritiden bei der Stute sind mikrobielle Infektionen. Die Erreger lassen sich in Schleimhautabstrichen des Endometriums oder in Uterusspülproben nachweisen. Obwohl bakteriell bedingte Endometritiden als eine der Hauptursachen für Fruchtbarkeitsprobleme bei Stuten angesehen werden (Dimock, 1935; Couto und Hughes, 1984; Watson, 1988; Asbury, 1992; Nikolakopoulos und Watson, 1999; Riddle et al., 2007), ist der Zusammenhang zwischen einer gestörten Reproduktion und nachgewiesenen Mikroorganismen nicht immer eindeutig herzustellen. Die Isolation von Bakterien aus dem Genitaltrakt bedeutet nicht automatisch, dass dieser auch erkrankt ist (Farrelly und Mullaney, 1964; Hughes et al., 1966; Scott et al., 1971; Witherspoon et al., 1972; Newcombe, 1978; Hughes, 1980). So können bei über 80 % der Stuten bis zu 72 Stunden nach der Bedeckung und 1 - 30 Tage nach dem Abfohlen Bakterien aus dem Genitaltrakt isoliert werden (Dimock, 1935; Byrans, 1962).

Allerdings ist es von großer Bedeutung, die Probe für die bakterielle Untersuchung direkt aus dem *Cavum uteri* und nicht von weiter kaudal gelegenen Lokalisationen, wie etwa der Zervix, zu entnehmen. Es konnte nachgewiesen werden, dass zervikal

Literatur

entnommene Tupferproben keinesfalls den Zustand *in utero* widerspiegeln (Wehrend et al., 2004; Klein et al., 2006, 2009).

Um eine korrekte Diagnose einer bakteriell bedingten Endometritis treffen zu können, sollten deshalb neben dem Nachweis entsprechender Keime auch Anzeichen einer Entzündung des Endometriums vorhanden sein (Knudsen, 1964; Scott et al., 1971; Kenney, 1978; Brook, 1985; Crickman und Pough, 1986).

Bei nahezu allen Bakterien, die Endometritiden verursachen können, handelt es sich um opportunistische Erreger, die den kaudalen Geschlechtstrakt sowie andere extragenitale Lokalisationen besiedeln. Insbesondere die *Fossa clitoridis* enthält mehr Bakterien als alle anderen Abschnitte des Reproduktionstraktes und dient den Mikroorganismen als Reservoir (Hinrichs et al., 1988; Huchzermeyer, 2003). Keime werden bei gesunden Stuten durch die natürlichen Abwehrbarrieren- und Mechanismen davon abgehalten, in die Zervix oder den Uterus aufzusteigen (Wittenbrink et al., 2008). Während der Hymenalring zu einer deutlichen Reduktion der unspezifischen Keimflora führt, scheint die Zervix vor allem als selektive Barriere gegen fakultativ pathogene Keime zu wirken (Klein et al., 2009).

Bei fehlenden Entzündungsanzeichen wird folgender Keimnachweis aus dem Uterus für apathogen gehalten oder eine Kontamination im Rahmen der Tupferprobenentnahme als Ursache für den positiven bakteriologischen Befund angesehen:

- α -hämolyisierende Streptokokken (Asbury, 1986, Riddle et al., 2007)
- *Enterobacter* spp. (Asbury, 1986)
- *Staphylococcus epidermidis* (Asbury, 1986)
- *Staphylococcus intermedius* (Waelchi et al., 1993)
- coliforme Keime (Waelchi et al., 1993)
- *Neisseria* spp. (Waelchi et al., 1993)
- *Bacillus* (Riddle et al., 2007)
- Mikrokokken (Riddle et al., 2007)

Causey (2007) ist allerdings der Meinung, dass es im gesunden Uterus keine Normalflora gibt und jeder Keim als potentiell pathogen anzusehen ist. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass eine geringgradige Keimbeseidlung in gesunden Uterushörnern vorhanden sein kann (Schmidt, 1988). *Corynebacterium spp.*, *Proteus spp.* und *Staphylococcus spp.* sollten nur bei deutlich sichtbaren Entzündungsanzeichen oder in einem eindeutigen ätiologischen Kontext als pathogen interpretiert werden (Asbury, 1986).

Die Annahme, dass eine Endometritis primär auf einer bakteriellen Infektion des Uterus beruht (Asbury und Lyle, 1993) gilt heute so nicht mehr. Der Fokus der Ursachenforschung richtet sich gegenwärtig vermehrt auf die Analyse von Insuffizienzen der uterinen Abwehr- und Selbstreinigungsmechanismen. Dennoch ist die Pathogenität einiger Keime als Ursache von Endometritiden unbestritten. Ein Großteil der Erkrankungsfälle wird durch nur wenige Bakterienarten verursacht (Albihn et al., 2003; Møller Nielsen, 2005; Klein et al., 2009). Dies sind:

- β -hämolisierende Streptokokken
- *Escherichia coli*
- *Escherichia coli variatio haemolytica*
- *Klebsiella spp.*
- *Pseudomonas spp.*
- *Staphylococcus aureus*

Die aufgeführten Bakterien können im Zuge einer Kontamination das empfindliche Gleichgewicht des Gebärmuttermiles leicht durch entzündliche Prozesse stören. Da diese Keime zu den dominierenden Keimgruppen in Vestibulum und Vagina zählen (Hinrichs et al., 1988; Klein et al., 2009), kann eine aufsteigende Infektion bei vielen Gelegenheiten im Rahmen des Reproduktionsgeschehens erfolgen. So müssen insbesondere die Bedeckung, instrumentelle Samenübertragung und die Geburt, aber auch Manipulationen im Rahmen der Diagnostik sowie ungünstige anatomische Gegebenheiten als mögliche Infektionsquellen angesehen werden (Asbury und Lyle, 1993).

Literatur

In diesem Zusammenhang sind β -hämolyisierende Streptokokken, insbesondere *Streptococcus zooepidemicus*, die am häufigsten gefundenen Bakterien. Ihr Anteil an Infektionen der Gebärmutter liegt zwischen 34 % (Riddle et al., 2007) bis zu 66 % (Watson, 2000; Albiñ et al., 2003; Causey, 2006).

Bei Stuten mit einer persistent-breeding-induced-endometritis ist *Streptococcus zooepidemicus* ebenfalls der am häufigsten auftretende Keim. Begünstigend für eine persistierende Besiedlung des Uterus wirken sich die adhäsiven Eigenschaften dieses Keims aus, mit denen er sich den endometrialen Epithelzellen anzuhaften und damit wichtigen Eliminationsmechanismen des Wirtes zu entziehen vermag (Ferreira-Dias et al., 1994; King et al., 2000). Ermöglicht wird dies durch fibronektinbindende Proteine (Lindmark et al., 1996) und eine Hyaluronsäurekapsel, die gleichzeitig einen Schutz vor Phagozytose bietet (Wibiwan et al., 1999).

Durch *Streptococcus zooepidemicus* freigesetzte Toxine schädigen das Endometrium, welches darauf mit einer Hyperämie sowie der Bildung von Flüssigkeit reagiert (Allen und Pycock, 1989). Entzündliches Sekret, das im Uteruslumen verbleibt, kann zusätzlich eine effektive Phagozytose behindern (Troedsson et al., 1993a). Kann die Flüssigkeit beseitigt werden, so wird der Keim für die uterinen Abwehrmechanismen angreifbar (Troedsson et al., 1995a).

Der Nachweis von *Escherichia coli* gelingt häufiger bei Stuten mit anatomischen Fehlstellungen der Perianal- und Vulvaregion. Diese sind prädisponierend für eine Pneumovagina und fäkale Kontamination des *Vestibulum vaginae* (LeBlanc, 1997). Auch konnte eine signifikante Korrelation zwischen wiederholtem symptomlosen Umrossen und dem Nachweis von *Escherichia coli* in Uterustupfern festgestellt werden (Albiñ et al., 2003). Das Auftreten von Hämolyse beim Ansatz auf Blut-Agar wurde bisher als Indikator für die Synthese von zellschädigenden, extrazellulär sezernierten Produkten und somit als besonders relevant im Zusammenhang mit einer durch *Escherichia coli* bedingten Endometritis angesehen (Wittenbrink et al., 2008). Bei speziellen Untersuchungen der Virulenzfaktoren von *Escherichia coli*-Isolaten, die im Rahmen uteriner Entzündungen nachgewiesen wurden, konnte jedoch nur bei wenigen Isolaten eine Hämolyse festgestellt werden (Albiñ et al., 2003, Chen et al., 2003).

Klebsiella spp. (insbesondere *Klebsiella pneumoniae*) und *Pseudomonas* spp. (insbesondere *Pseudomonas aeruginosa*) werden häufig im Zusammenhang mit venerisch übertragbaren Krankheiten erwähnt (Dimock und Edwards, 1927; Hughes, 1980). Da Hengste oftmals als symptomlos infizierte Carrier fungieren, erfolgt die Infektion zumeist durch den Deckakt, aber auch durch kontaminiertes Sperma bei instrumenteller Insemination (Merkt et al., 1980a; Atherton und Pitt, 1982; Blanchard et al., 1987; Klug und Sieme, 1992).

Bei Stuten, die im Natursprung gedeckt wurden, ist eine verminderte Fruchtbarkeit im Zusammenhang mit einer nachgewiesenen Klebsiellen- oder Pseudomonas-Infektion beschrieben (Couto und Hughes, 1993). Eine Kolonisation am Penis des Hengstes und somit auch eine erhöhte Übertragungswahrscheinlichkeit dieser beiden Keimarten wird durch ein häufiges Waschen dieses Körperteils begünstigt, wie es im Rahmen einer Behandlung gegen den Erreger der kontagiösen equinen Metritis praktiziert wird (Bowen et al., 1982; Hüthwol et al., 1989).

Ähnlich wie die Streptokokken haftet sich auch *Klebsiella pneumoniae* mittels Pili und einer Polysaccharidkapsel, die zusätzlich einen Schutz vor Phagozytose bietet (Domenico et al., 1994), an die Epithelzellen des Endometriums an.

Pseudomonas aeruginosa vermag sich durch Biofilmbildung effektiv gegen antimikrobiell wirksame Substanzen zu schützen und kann dadurch persistierende, opportunistische Infektionen verursachen (Costerton et al., 1995; Parkins et al., 2001). Zudem wird die intrauterine Verabreichung von Antibiotika sowie eine verminderte uterine Abwehr als begünstigend für eine Klebsiellen- oder Pseudomonas-Infektion angesehen (LeBlanc, 1997).

Der am häufigsten isolierte Keim mit anaerobem Wachstum bei Stuten mit einer Endometritis ist *Bacteroides fragilis*. Er wird zumeist post partum und in der anschließenden Fohlenrose nachgewiesen (Ricketts und Mackintosh, 1987). Andere Autoren sind der Meinung, dass anaerobe Bakterien keine signifikante Rolle bei der Stute im Puerperium spielen und schnell eliminiert werden können (Purswell et al, 1989).

Ein Erreger, der früher von erheblicher Bedeutung war, heute jedoch nur noch sporadisch auftritt, ist *Taylorella equigenitalis*. Dieser führt zum Krankheitsbild der

Literatur

kontagiösen equinen Metritis. Während Hengste asymptomatische Überträger dieser sexuell transmissiblen Erkrankung sind (Timoney, 1996), leiden betroffene Stuten an einer bereits nach zwei Tagen schwer ausgeprägten purulenten Vaginitis, Zervizitis und Endometritis (Crowhurst, 1977; Ricketts et al., 1977). Obwohl die Stuten bereits nach kurzer Zeit klinisch nicht mehr auffällig sind, bleiben sie dennoch persistent infiziert. Bevorzugtes Rückzugsgebiet ist die *Fossa clitoridis* (Timoney, 1996), beim Hengst die *Fossa glandis* (Tillmann et al., 1982).

Nur ein geringer Prozentsatz der Endometritiden wird durch Pilze wie *Aspergillus*, *Candida* und *Mucor* verursacht. Meist handelt es sich um opportunistische Infektionen aufgrund von:

- chronisch gestörten vaginalen / -uterinen Milieu / -Abwehrmechanismen (Stout, 2008)
- Pneumovagina (Zafracas, 1975)
- intrauteriner Antibiotika-Gabe (Troedsson, 1997; Dascanio et al., 2001)

2.1.3 Nichtinfektiöse Ursachen der Endometritis

Ein Schwerpunkt der Forschung liegt seit dem letzten Jahrzehnt auf der Analyse der Pathomechanismen, die zu einer sogenannten persistent-breeding-induced-endometritis führen. Diese ist abzugrenzen von der physiologischen breeding-induced-endometritis, wie sie bei jeder Stute nach einer Belegung, egal ob im Natursprung oder durch instrumentelle Besamung, als Reaktion auf das Sperma auftritt (Kotilainen et al., 1994; Troedsson, 1999; Troedsson et al., 1995b, 1998, 2001). Dabei handelt es sich um einen physiologischen Prozess, um überflüssiges Sperma, Seminalplasma und Debris aus dem Uterus zu entfernen (Pycock, 2007).

Je nach Stärke der Reaktion bei der jeweiligen Stute können alle Anzeichen einer akuten Endometritis wie vaginale und zervikale Hyperämie, Vaginalausfluss, intrauterine Flüssigkeitsansammlungen und der zytologische Nachweis von Entzündungszellen zu registrieren sein (Asbury und Lyle, 1993). Neutrophile Granulozyten treten erstmals eine Stunde nach der Besamung auf, und erreichen

nach 6 – 12 Stunden ihr Maximum. Nach 48 Stunden sollten nur noch wenige Entzündungszellen im zytologischen Ausstrich gefunden werden (Katila, 1995).

Früher wurde von der These ausgegangen, dass eine solche Entzündungsreaktion die Folge einer bakteriellen Kontamination im Rahmen der Bedeckung darstellt (Peterson et al., 1969). Heute ist bekannt, dass die Anzahl an Bakterien, die während der instrumentellen Besamung oder bei einer Bedeckung im Natursprung in den Uterus gelangt, niedrig ist und diese Keime in der Regel schnell und effektiv eliminiert werden können (Kotilainen et al., 1994; Katila, 1995).

Als Auslöser dieser Entzündungsprozesse werden mittlerweile die Spermatozoen angesehen (Kotilainen et al., 1994; Troedsson et al., 1995b). So konnte festgestellt werden, dass die Intensität der Entzündung mehr von der Konzentration der Samenzellen als vom Volumen der Besamungsportion abhängt. Eine hohe Spermiendichte in einem kleinem Volumen, wie dies bei Tiefgefriersperma der Fall ist, provoziert demnach eine stärkere Entzündungsantwort als niedrige Konzentrationen in einem großen Volumen (Kotilainen et al., 1994; Fiala et al., 2007).

Ähnlich den Prozessen, wie sie bei einer bakteriellen Infektion ablaufen, führen die Spermatozoen zu einer Aktivierung der Komplement-Kaskade, die mittels Chemotaxis neutrophile Granulozyten anlockt (Troedsson et al., 1995a; Bucca, 2008). Diese setzen aus ihrer Zellmembran Prostaglandin $F_{2\alpha}$ frei, was zu Kontraktionen der glatten Muskulatur des Endometriums führt (Troedsson, 1999). Da nur eine geringe Anzahl an Spermatozoen die befruchtungsrelevanten Areale im Eileiter erreicht und der Rest des Ejakulates wieder zurück in den Uterus fließt und von dort entfernt werden muss, werden diese Kontraktionen als Schlüsselfaktor für eine adäquate Clearance nach der Belegung angesehen (Troedsson, 1999; Troedsson et al., 2008).

Bei Stuten mit guter uteriner Clearance sollten diese Prozesse nach 24 bis 36 Stunden abgeschlossen sein (Katila, 2005). In experimentellen Studien werden Stuten als resistent eingestuft, wenn sie in der Lage sind, sich innerhalb von 96 Stunden nach einer bakterienhaltigen Infusion in den Uterus selbst zu reinigen (Troedsson und Liu, 1991). Braucht eine Stute länger als zwei bis drei Trage um intrauterine Flüssigkeit und Entzündungsprodukte abzustößen, so ist dies ein

Literatur

Hinweis auf eine bestehende Insuffizienz der uterinen Reinigungs- und Abwehrmechanismen (LeBlanc et al., 1994b; Katila, 1995; Troedsson, 1997). In der Folge entwickeln diese empfänglichen Stuten häufig eine persistent-breeding-induced-endometritis. Etwa 15 % der gesamten Zuchtpopulation ist von diesem Problem betroffen (Pycock und Newcombe, 1996; Zent und Troedsson, 1998).

Meist handelt es sich um ältere, multipare Stuten, die zudem häufig Anzeichen einer chronischen Entzündung des Endometriums aufweisen (Troedsson et al., 1993a). Neben dem Nachweis von Flüssigkeit im *Cavum uteri* während des Diöstrus (Troedsson, 1997), gelten Flüssigkeitsansammlungen von über zwei Zentimeter Durchmesser während des Östrus als sicherer Hinweis darauf, dass es sich um eine solche empfängliche Stute handelt (Brinsko et al., 2003). Flüssigkeitsansammlungen im Östrus, auch wenn diese oftmals nicht entzündlichen Ursprungs sind (Reilas et al., 1997; Pycock, 2007) führen zu einer signifikant erniedrigten Trächtigkeitsrate (Pycock und Newcombe, 1996a).

Die Tendenz zur Ansammlung von intrauteriner Flüssigkeit wird mittlerweile auf einen intrinsisch bedingten Kontraktionsdefekt des Myometriums zurückgeführt (Rigby et al., 2001). Die verminderte Kontraktilität wird zudem mit einer vermehrten Einlagerung von Kollagen in das Myometrium, wie es bei älteren Stuten oftmals im histologischen Schnitt bei der Analyse von Uterusbiopsien gesehen werden kann, in Verbindung gebracht (Kenney und Doig, 1986). Troedsson et al. (1993b) konnten eine reduzierte elektrische myometriale Aktivität als Antwort auf eine Bakterieninfusion in den Uterus bei empfänglichen Stuten gegenüber gesunden Stuten feststellen. Auch gesunde Stuten akkumulieren Flüssigkeit nach einer Bakterieninfusion, wenn ihnen zuvor myometriumsrelaxierende Substanzen wie der β_2 -Agonist Clenbuterol verabreicht werden (Nikolakopoulos und Watson, 1999). Ähnliche Ergebnisse wurden durch die Applikation des nichtsteroidalen Antiphlogistikums Phenylbutazon erzielt, welches die Synthese von Prostaglandin $F_{2\alpha}$ hemmt, wodurch dessen kontraktiler Effekt auf das Myometrium blockiert wird (LeBlanc, 1994a). Auch Nikolakopoulos et al. (2000) sehen in der reduzierten Ansprechbarkeit des Myometriums auf Prostaglandin $F_{2\alpha}$ eine der Ursachen für die Ansammlung von Flüssigkeit im Uteruslumen von Stuten.

Verstärkend wirken sich ein nach ventral abgesenkter Uterus (LeBlanc et al., 1998) sowie eine mangelhafte Lymphdrainage aus (LeBlanc et al., 1995). Auch Alterationen des Gefäßsystems werden als Ursache diskutiert (Inoue et al., 2000). Letztendlich führt die persistierende Entzündung zu einer verfrühten und erhöhten Freisetzung von Prostaglandin $F_{2\alpha}$ aus dem Endometrium, wodurch es zu einer vorzeitigen Luteolyse des trächtigkeitserhaltenden Gelbkörpers und damit auch zu einem Verlust des Embryos kommt (Neely et al., 1979). Neben diesem indirekten Effekt erzeugen aber auch die Flüssigkeit, Bakterien und Entzündungsprodukte an sich ein Milieu, die es der zwischen dem fünften und sechsten Tag nach der Befruchtung ins Uteruslumen absteigenden Fruchtanlage unmöglich macht, sich im Endometrium einzunisten (Smith et al., 1971; Waites und Bell, 1982).

2.2 Indikation der exfoliativen Endometriumszytologie bei der Stute

Bei der exfoliativen Endometriumszytologie handelt es sich um ein einfaches und sicheres diagnostisches Verfahren im Rahmen der gynäkologischen Untersuchung von Zuchtstuten. Es kann ohne großen Aufwand in routinemäßigen Untersuchungen wie die Tupferprobenentnahme für eine bakteriologische Untersuchung eingegliedert werden.

Bereits Wingfield Digby (1978) wies darauf hin, dass die zytologische Untersuchung einen wichtigen Bestandteil in der routinemäßigen Diagnostik von Uteruserkrankungen bei der Stute darstellen sollte. Auch in aktuellen Veröffentlichungen wie von Aguilar et al. (2005) wird auf die Bedeutung der Endometriumszytologie hingewiesen. Nach ihrer Ansicht sollte eine gründliche Zuchttauglichkeitsuntersuchung neben der klinischen und bakteriologischen Untersuchung sowie einer Endometriumsbiopsie auch eine Endometriumszytologie beinhalten. Zur exakten Absicherung von Diagnosen hinsichtlich des Zustandes des Endometriums empfehlen Bourke et al. (1997) ebenfalls die Entnahme von Uteruszytologien.

Es gibt grundsätzlich zwei Ansätze, die Endometriumszytologie als weiterführende Diagnostik zu nutzen. Zum einen können die Ausstriche unter dem Aspekt der Funktionszytologie zur Ermittlung des zytohormonalen Zellstatus interpretiert werden

Literatur

(Tillmann und Meinecke, 1980). Das Prinzip basiert darauf, dass sich die Zellmorphologie des Genitaltraktes unter dem Einfluss der Geschlechtshormone in den verschiedenen Zyklusabschnitten verändert. Dieser Zusammenhang wird bei der Auswertung von Vaginalzytologien zur Deckzeitbestimmung bei der Hündin genutzt, wo das Verfahren in der Routinediagnostik angewandt wird und sich somit in der Praxis etabliert hat (Tammer et al., 1994).

Diese Art der Zyklusdiagnostik konnte bei Stuten jedoch nicht erfolgreich umgesetzt werden. Aufgrund spezifischer Zellbilder gelang lediglich die Zuordnung zu vier Phasen mit jahreszeitlich bedingter unterschiedlicher Reproduktionsaktivität (Freeman et al., 1986):

- Jahreszeitlich bedingter Anöstrus
- Übergangsperiode im Frühjahr
- Aktives Zyklusgeschehen
- Übergangsperiode im Herbst

Da beim Pferd ohnehin eine Reihe anderer Untersuchungsmethoden (rektale und ultrasonographische Untersuchung) für diese Indikation, die zudem zuverlässiger und genauer erprobt sind, angewandt werden, ist dieser Aspekt zu vernachlässigen.

Weitaus wichtigere und aus diagnostischer Sicht wertvollere Informationen liefert die sogenannte Differentialzytologie (Tillmann und Lauer, 1977; Tillmann und Meinecke, 1980). Der Fokus bei der Auswertung der Ausstriche liegt in diesem Fall auf dem Vorkommen oder der Abwesenheit körpereigener Entzündungszellen, vor allem von polymorphkernigen Leukozyten.

Die Hauptindikation für den Einsatz der exfoliativen Endometriumszytologie liegt in der Diagnose der Endometritis bei der Stute. Erstmals beschrieben wurde dieses Einsatzgebiet in einer Arbeit von Knudsen (1964). In seiner Studie verglich er die Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung mit den Auswertungen von Endometriumszytologien. Dabei stellte er eine sehr gute Übereinstimmung zwischen einem bakteriologisch positivem Befund und dem Vorkommen von neutrophilen Granulozyten in dem zytologischen Abstrich fest. Er hielt die Korrelation für so groß,

dass er allein das Ergebnis der Zytologie zur Diagnosestellung als ausreichend betrachtete.

Der Zusammenhang zwischen bakteriologischen und zytologischen Befunden wurde in späteren Studien von verschiedenen Autoren übereinstimmend bestätigt (Lauer, 1977; Tillmann und Meinecke, 1980; Knudsen, 1982; Asbury, 1984a; Couto und Hughes, 1984; Slusher et al., 1984; Brook, 1985; La Cour und Sprinkle, 1985; Ball et al., 1988; Reinemund, 1988; Roszel und Freeman, 1988; Brook, 1992; Wehrend et al., 2004).

In einer Studie von Brook (1985) an 134 Stuten korrelierten die Befunde der zytologischen mit der bakteriologischen Untersuchung in 79 % der Fälle. 5 % der Proben war bakteriologisch positiv und zytologisch negativ. Weitere 8 % waren bakteriologisch negativ und zytologisch positiv. Riddle et al. (2007) hingegen fanden nur bei 64% der Stuten mit einem positiven bakteriologischen Befund auch in der Zytologie Anzeichen einer Entzündung.

Ein großer Vorteil der Zytologie gegenüber der bakteriologischen Untersuchung liegt in der schnellen Verfügbarkeit der Ergebnisse (Knudsen, 1964; Wingfield Digby, 1978; Brooke, 1992; Møller Nielsen, 2005). Während die Befunde der bakteriologischen Untersuchung erst nach 48 bis 72 Stunden vorliegen, sind die Ergebnisse der zytologischen Untersuchung bereits am Tag der Entnahme nutzbar.

Wingfield Digby (1978) stellte fest, dass Stuten, welche keinerlei klinische Anzeichen einer Endometritis und Infektion zeigten, keine Entzündungszellen in der Zytologie aufwiesen. Auch andere Autoren konnten bestätigen, dass bei genitalgesunden Stuten zu keiner Phase des Zyklus neutrophile Granulozyten nachzuweisen sind (Knudsen, 1964; Tillmann und Lauer, 1977; Wingfield Digby und Ricketts, 1982). Somit ist es möglich, mittels einer Zytologie Stuten mit Entzündungen des Endometriums zu detektieren und den Verdacht auf eine bestehende Endometritis zu erhärten, bevor die Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung vorliegen. Dieses ist zudem ohne großen materiellen Aufwand unter Praxisbedingungen durchführbar (Møller Nielsen, 2005).

Knudsen (1982) maß der Endometriumszytologie einen sehr hohen Stellenwert bei. Er ließ zytologisch negative Stuten sofort zur Bedeckung zu, während von Stuten mit

Literatur

auffälligen zytologischen Befunden erst eine bakteriologische Untersuchung durchgeführt wurde. Von besonderem Interesse war dies in früheren Zeiten, wo der weitaus größte Anteil der Stuten noch im Natursprung gedeckt wurde. Dieses ist heute noch in der Vollblutzucht der Fall, wo die Hengste ausschließlich im Natursprung decken dürfen. Besonders hilfreich ist dieses Vorgehen, wenn eine Ovulation kurz bevorsteht und nicht mehr genügend Zeit bleibt, eine bakteriologische Untersuchung durchzuführen. Mit Hilfe der Zytologie lässt sich dennoch eine Entscheidung auf der Basis auswertbarer Befunde fällen (Couto und Hughes, 1984).

Wingfield Digby (1978) war der Meinung, dass die Zytologie eine Inflammation des Uterus besser nachzuweisen vermag als eine bakteriologische Untersuchung. Nach Untersuchungen an 4024 Stuten im Zeitraum von 1978 bis 1981 kamen Wingfield Digby und Ricketts (1982) zu dem Schluss, dass es sich bei der Endometriumszytologie gegenüber der bakteriologischen Untersuchung sogar um einen direkteren Test für die Diagnose einer akuten Endometritis handelt. Die bakteriologische Untersuchung allein halten sie für eine indirekte und nicht akkurate Methode, um eine akute Endometritis vor der Bedeckung zu diagnostizieren.

Etabliert hat sich die Endometriumszytologie als wichtiges Diagnostikum bei der Aufdeckung von chronischen und symptomarmen Entzündungen der Gebärmutterschleimhaut. Etliche Autoren halten diese Methode zur Erkennung von latenten Genitalinfektionen bei klinisch gesund erscheinenden Tieren gegenüber einer ausschließlichen bakteriologischen Untersuchung für überlegen (Ricketts, 1978; 1981; Wingfield Digby und Ricketts, 1982; Tillmann und Meinecke, 1982; Mattos et al., 1984).

So konnten Mattos et al. (1984) bei Untersuchungen an Stuten, denen sowohl Material für eine bakterielle Untersuchung als auch für die Anfertigung von Zytologien entnommen wurde, die Bedeutung der Endometriumszytologie für die Feststellung genitaler Veränderungen belegen. Klinisch krankheitsverdächtige und pathohistologisch als genital erkrankte Tiere wurden dabei ausnahmslos durch die Auswertung der Zytologien erkannt. Im Gegensatz dazu signalisierte in mehr als einem Drittel der Untersuchungsfälle die Tupferprobe die Veränderungen nicht. Zu ähnlichen Ergebnissen kam bereits Wingfield Digby (1978) in Studien an Stuten mit einer vorberichtlich persistenten Endometritis. Diese zeigten zu 91 % zytologische

Anzeichen einer akuten Endometritis, wohingegen nur bei 45 % der Stuten signifikante bakteriologische Befunde erhoben werden konnten. Auch Riddle et al. (2007) gelang es durch zytologische Untersuchungen bei doppelt so vielen Stuten eine Endometritis zu diagnostizieren als mittels der zeitgleich durchgeführten bakteriologischen Untersuchung.

Von hoher praktischer Relevanz ist die Auswertung von Endometriumszytologien bei der Interpretation unspezifischer Befunde der bakteriologischen Untersuchung. Beim Pferd spielen unspezifische, nur fakultativ pathogene opportunistische Erreger als Infertilitätsursache eine wichtige Rolle (Tillmann und Meinecke, 1980). Deren Nachweis muss nicht zwingend mit sichtbaren Entzündungsanzeichen einhergehen (Witherspoon et al., 1972; Huchzermeyer, 2003). Desweiteren konnte auch in gesunden Uterushörnern eine geringgradige Keimbesiedlung nachgewiesen werden (Schmitt, 1988). Aufgrund der Unterschiede in der Virulenz der Erreger und der individuell unterschiedlichen Reaktion des Endometriums auf eine solche Keimbesiedlung ist die Beurteilung von isolierten Keimnachweisen schwierig (Liu, 1988). Die Beurteilung der Zytologien in Bezug auf das Vorhandensein oder die Stärke einer lokalen Entzündungsreaktion hilft, die Relevanz eines bakteriologischen Befundes besser einordnen zu können.

Genutzt wird die Endometriumszytologie auch als Grundlage für die Erstellung von Prognosen hinsichtlich der Trächtigaussicht. Derartige Untersuchungen führten La Cour und Sprinkle (1985) während zwei aufeinander folgender Zuchtjahre an 190 Stuten durch. Sie stellten sechs Kategorien zur Bewertung und Einschätzung der Zytologieergebnisse von Zuchtstuten auf (Tabelle 2). Die Einteilung beruht primär auf der Anwesenheit / Abwesenheit von Endometriumszellen und der Anzahl neutrophiler Granulozyten pro Gesichtsfeld bei 100facher Vergrößerung.

Literatur

Tabelle 2: Kategorien anhand des zytologischen Befundes nach LaCour und Sprinkle, 1985 (EZ = Endometriumzellen, PMN = neutrophile Granulozyten, GF = Gesichtsfeld, \bar{x} = durchschnittlich, % = Prozent)

\bar{x} – Kategorie/ Zuchtsaison	Zellbild	Konzeptionsrate (%)
0	überwiegend EZ geringe Mengen Debris	87
1	überwiegend EZ etwas Debris und Mukus vereinzelt mononukleäre Zellen	87
2	Anzahl EZ abnehmend gehäuft Debris < 1 PMN pro GF	86
3	viel Debris, Blut oder Makrophagen 2 bis 3 PMN pro GF	50
4	> 3 PMN pro GF	25
5	ausschließlich PMN	25

Stuten der Kategorien 0 bis 2 weisen demnach annähernd physiologische Zytologiebefunde auf. Die Konzeptionsraten lagen um die 86 %, bei Stuten der Kategorie 3 hingegen nur noch bei 50 %. Stuten der Kategorie 4 oder 5 konzipierten nur in 25% der Fälle. Anhand der Einordnung in die jeweils zutreffende Zytologie-Klasse konnte somit eine sichere Prognose hinsichtlich der Trächtigaussicht gestellt werden.

Zu ähnlichen Ergebnissen, wenn auch auf einer deutlich geringeren Probandenzahl basierend, kamen auch Mattos et al. (1984). Sie stellten fest, dass die Konzeptionsrate bei zytologisch auffälligen, klinisch und mikrobiologisch aber unverdächtigen Stuten extrem niedrig war. Nur knapp 5 % der zytologisch als krankheitsverdächtig erkannten Stuten wurden in der untersuchten Zuchtsaison tragend.

Ergebnisse einer groß angelegten Studie (Anzahl Proben 2044) aus Kentucky in den Zuchtjahren 2001 bis 2004 (Riddle et al., 2007) zeigen ebenfalls eine signifikante Korrelation zwischen dem zytologischen Befund und der Trächtigkeitsrate. Stuten mit 2 - 5 neutrophilen Granulozyten/ Gesichtsfeld (moderate Entzündung) wurden doppelt so oft tragend wie Stuten mit > 5 neutrophilen Granulozyten/ Gesichtsfeld (schwere Entzündung). Stuten mit 0 - 2 neutrophilen Granulozyten/ Gesichtsfeld (milde Entzündung) wiesen Trächtigkeitsraten auf, die 1,3 bis 3mal höher lagen als diejenigen von Stuten mit einer milden bis schweren Entzündung.

Insbesondere in Bezug auf Erkrankungen des Endometritis-Komplexes hat sich die Endometriumszytologie als wichtiges Instrument bewährt. Während in der Humanmedizin die Zytologie von endometrialen Abstrichen schon seit etlichen Jahrzehnten zur Diagnostik von uterinen Erkrankungen genutzt wird (Cary, 1943; Hecht, 1952; Romberg, 1954; Ferreira, 1956), hat sich diese Art der Diagnostik in der Reproduktionsmedizin beim Pferd bisher kaum etablieren können (Walter und Wehrend, 2007, 2009).

2.3 Technik und Durchführung der exfoliativen Endometriumszytologie bei der Stute

2.3.1 Entnahmezeitpunkt

Die Entnahme von intrauterinen Proben ist bei der Stute während jeder Zyklusphase möglich, da die Zervix beim Pferd unabhängig vom Zyklusstand manuell geweitet werden kann (Shin et al., 1979; Hughes, 1980).

Die meisten Autoren empfehlen jedoch die Entnahme solcher Proben im Östrus (Wingfield Digby, 1978; Conboy, 1978; Wingfield Digby und Ricketts, 1982; Couto und Hughes, 1984; La Cour und Sprinkle, 1985; Brook, 1992; Møller Nielsen, 2005), idealerweise zu Beginn des Östrus (Allen und Newcombe, 1979; Wollcock, 1980; Asbury, 1982). Dabei sollte per Ultraschall im B-Mode-Verfahren ein Uterus-Ödem deutlich sichtbar und ein über 30 Millimeter großer Follikel darstellbar sein (Aguilar et al., 2005). Zu diesem Zykluszeitpunkt können die Entnahmegерäte aufgrund der relaxierten Zervix leicht eingeführt werden (Conboy, 1978; Couto und Hughes, 1984; Brook, 1992), die endometriale Sekretion sorgt zudem für eine ausreichende

Literatur

Benetzung der Entnahmegeräte mit Material für die Anfertigung der Ausstriche. Brook (1992) weist in diesem Zusammenhang darauf hin, dass die Zytologieergebnisse von Stuten mit einer chronischen, subklinischen Endometritis fälschlicherweise oft negativ sind, wenn die Proben außerhalb des Östrus genommen wurden. Eine Abnahme der Zahl an neutrophilen Granulozyten unter steigendem Progesteron-Einfluss konnte sicher für die Zervix der Stute nachgewiesen werden (Walter, 2006).

Hinzu kommt, dass die uterinen Abwehrmechanismen, welche einen zusätzlichen Schutz vor einer iatrogen bedingten Infektion der Gebärmutter bieten, während des Östrus gesteigert sind (Hughes, 1980). Die Gefahr einer solchen Infektion ist im Diöstrus erhöht, da die körpereigene Infektionsabwehr im Uterus unter Progesteron-Einfluss herabgesetzt ist (Evans et al., 1986; Allen und Bracher, 1992; Brook, 1992; Waelchi et al., 1993; Katila, 1996). Dennoch ist es unter bestimmten Umständen angezeigt, die Proben für die Zytologien auch außerhalb des Östrus zu gewinnen und auszuwerten. Dies kann notwendig sein, wenn der Zeitraum bis zur nächsten Ovulation noch für therapeutische Maßnahmen genutzt werden soll (Waelchi et al., 1993).

2.3.2 Entnahmetechnik

Die Abläufe zur Vorbereitung der Stute für die Probenentnahme sind weitgehend standardisiert und werden seit mehreren Jahrzehnten routinemäßig in der Praxis angewandt. Nach Fixierung der Stute wird zuerst der Schweif einbandagiert. Anschließend wird die Vulva gründlich mit einer Povidon-Iod oder einer milden Wasser-Seifen-Lösung gewaschen. Es folgt ein Abtrocknen mit sauberen Tüchern (Solomon et al., 1972; Wingfield Digby und Ricketts, 1982; Brook, 1985; La Cour und Sprinkle, 1985; Ball et al., 1988). Die Verwendung von Einmalhandschuhen und sterilem Gleitgel für die Untersuchung durch den durchführenden Tierarzt ist selbstverständlich.

Bei der Auswahl des Entnahmegerätes muss berücksichtigt werden, dass nur bedeckte Entnahmesysteme zum Einsatz kommen sollten. Für die bakteriologische Untersuchung ist die Notwendigkeit der Verwendung von doppelt geschützten

Entnahmesystemen bereits erwiesen (Blanchard et al., 1981a). Beim Gebrauch von unbedeckten Systemen besteht die Gefahr einer unbeabsichtigten Kontamination mit Mikroorganismen aus der Zervix sowie der Vagina. Dies führt zu falsch positiven Ergebnissen in der bakteriologischen Untersuchung, wodurch die Korrelation zwischen dem Vorkommen von neutrophilen Granulozyten und dem von Bakterien verschoben wird (Shin et al., 1979; Wingfield Digby und Ricketts, 1982; Klein et al., 2009).

Die Wahl des Entnahmeverfahrens kann das Ergebnis von Endometriumszytologien erheblich beeinflussen. Die Verwendung von unbedeckt gewonnenen Proben ist kein sicherer Indikator für das Vorhandensein von neutrophilen Granulozyten in der Gebärmutter (Aguilar et al., 2005). In Versuchen, in denen das Material für die Untersuchung zu experimentellen Zwecken mit dem bloßen Finger entnommen und auf einen Objektträger übertragen wurde, wiesen die Proben zu 87,8 % neutrophile Granulozyten auf. Desweiteren konnten in diesen Proben auch Vaginalzellen gefunden werden (Aguilar et al., 2005).

Nachdem bereits Brook (1992) das Vorhandensein von neutrophilen Granulozyten in der Vagina als physiologischen Zustand beschreibt, bestätigt die Studie von Aguilar et al. (2005) die ständige Anwesenheit von neutrophilen Granulozyten in der Zervix und der Vagina, was die Notwendigkeit der Verwendung von bedeckten Entnahmesystemen unterstreicht. Walter (2006) konnte jedoch nur bei drei von 21 untersuchten, klinisch unauffälligen Stuten neutrophile Granulozyten in einer exfoliativen Zervix-Zytologie nachweisen.

Das Einführen der Entnahmegерäte kann sowohl manuell als auch mit Hilfe eines Polanski-Spekulums erfolgen. Allerdings sollte beachtet werden, dass beim Einführen eines Spekulums Luft in den kaudalen Geschlechtstrakt gelangt, was als nachteilig anzusehen ist (Brook, 1992).

Bei der manuellen Entnahme mittels geschlossener Entnahmesysteme schützt sich der Untersucher mit einem Plastikhandschuh, der mit sterilem Gleitgel benetzt wird. Die Zervix wird mit einem Finger geweitet, durch die der Tupfer mitsamt der äußeren Hülle durchgeschoben wird. Im *Cavum uteri* wird dann der innere Tupferträger vorgeschoben (Wingfield Digby, 1978; Wingfield Digby und Ricketts, 1982; Couto und Hughes, 1984; La Cour und Sprinkle, 1985; Brook, 1992; Møller Nielsen, 2005).

Literatur

Für die bedeckte Entnahme stehen verschiedene Systeme zur Verfügung. Knudsen (1964), der die Endometriumszytologie bei der Stute als diagnostisches Verfahren etablierte, nutzte den nach ihm benannten Knudsenkatheter zur Entnahme. Dieser besteht aus einer Metallspirale und Ausbohrungen, in die Baumwollfäden eingezogen werden können. Während das an der Spirale anhaftende Material für die zytologische Untersuchung genutzt wird, können die Baumwollfäden zur bakteriologischen Untersuchung eingeschickt werden.

Pohl et al. (1977) beschreiben die Verwendung von Tupfern aus Nabelkompressen, die mit Hilfe eines starren Metallstabes eingeführt werden. Sie erzielten damit eine doppelt so hohe Ausbeute an Material für die zytologische Untersuchung wie mit anderen damals verfügbaren Tupfern.

Mattos et al. (1984) bedienen sich handelsüblicher Stiehlupfer, die an einem entkeimten Klinikupferentnahmegerät nach Merkt befestigt werden.

Seit langer Zeit verbreitet ist die Nutzung von kommerziellen Baumwolltupfern, wie sie auch für die Probenentnahme zur bakteriologischen Untersuchung genutzt werden (Wingfield Digby, 1978; Wingfield Digby und Ricketts 1982; Asbury, 1984a; Crickman und Pugh, 1986; Brook, 1992; Card, 2005). Durch die Verwendung von sterilen Objektträgern ist es möglich, den Tupfer sowohl für die Gewinnung von Material für die Zytologien, als auch für die bakteriologische Untersuchung zu verwenden. Manche Autoren bevorzugen die Entnahme von zwei Tupfern, so dass für jede Untersuchung ein separater Tupfer zur Verfügung steht (Ball et al. 1988). Zu beachten ist allerdings, dass dieses Entnahmeverfahren zu Verformungen an den Zellen führt, was sich negativ auf die Qualität des Ausstriches auswirkt (Britton, 1982; Couto und Hughes, 1984; Brook, 1992; Bourke et al., 1997; Dascanio et al., 1997). Auch erschweren die Haare der Baumwolle die Interpretation (Britton, 1982), weswegen Couto und Hughes (1984) Calcium-Alginat-Tupfer bevorzugen. Diese dürfen allerdings nur in einer 360° Bewegung entnommen, und nicht wie die Baumwolltupfer einfach hin- und her bewegt werden, da sonst ebenfalls Fasern verloren gehen. Berichtet wird auch über die Benetzung der Tupfer mit steriler Kochsalzlösung vor der Probenentnahme. Dadurch gelingt es mehr zelluläres Material zu gewinnen, zudem werden die Verformungen an den Zellen vermindert

(Crickmann und Pugh, 1986; Waelchi et al., 1988; Dascanio et al., 1997; Dascanio, 2003).

Üblich ist in den USA auch die Entnahme mit dem sogenannten Kalayjian culture instrument[®]. Dabei handelt es sich um ein Instrument, das sowohl über einen Calcium-Alginat-Tupfer für die bakteriologische Untersuchung, als auch über eine Kappe zur Aufnahme von zellulärem Material verfügt. Beides kann in einem Arbeitsgang entnommen werden (Riddle et al., 2007). Das in der Kappe aufgefangene zelluläre Material wird auf einen Objektträger übertragen und mit einem zweiten Objektträger wie bei der Anfertigung eines Blutausstriches ausgestrichen. Es kommt zu deutlich weniger Verformungen an den Zellen als bei der Entnahme mit Baumwolltupfern. Da es sich allerdings nur um ein einfach geschütztes System handelt, muss das Gerät beim Zurückziehen mit der Handfläche geschützt werden, um Kontaminationen mit Zervikal- und Vaginalzellen zu verhindern (Dascanio et al., 1997).

Bei der Interpretation der Zytologie sollte bedacht werden, dass durch die bisher beschriebenen Verfahren nur ein kleiner, eng lokalisierter Bereich erfasst wird, der nicht den Zustand des gesamten Endometriums adäquat widerspiegelt (Roszel und Freeman, 1988). Dies gilt auch für andere diagnostische Verfahren wie der Biopsie oder der Tupferprobe zur bakteriologischen Untersuchung, die ebenfalls routinemäßig im Rahmen der gynäkologischen Untersuchungen eingesetzt werden.

Bei subfertilen Stuten konnten gute Ergebnisse mittels einer Low-Volume-Uterus-Flush-Technik erzielt werden. Dabei werden 50 bis 60 Milliliter steriler Kochsalzlösung mittels einer auf einer Spritze aufgesetzten Pipette, wie sie auch zur künstlichen Insemination beim Pferd eingesetzt wird, in den Uterus instilliert. Von rektal wird der Uterus manuell massiert, um die Flüssigkeit gleichmäßig zu verteilen. Dann wird die Pipettenspitze manuell hin- und her bewegt und die Flüssigkeit aspiriert. Im Durchschnitt lassen sich ein bis fünf Milliliter zurückgewinnen. Diese werden dann in einem Plastikröhrchen mit fünf bis zehn Millilitern einer 40 %igen Ethanollösung vermischt. Anschließend wird der Inhalt einige Minuten zentrifugiert und das zentrifugierte Sediment zur Anfertigung der Zytologien und der bakteriologischen Untersuchung genutzt. Der Vorteil dieser Technik gegenüber der Entnahme mittels Tupfer oder einer Biopsie liegt darin, dass Material von einer

Literatur

größeren Oberfläche gewonnen werden kann. Dies erhöht die Aussagekraft deutlich (Slusher et al., 1984). Zudem ist die Qualität der Zellmorphologie deutlich besser als bei Ausstrichen, die aus Tupfern gewonnen werden (Dascanio et al., 1997).

Insbesondere bei Problemfällen, wie der Diagnostik bei subfertilen Stuten, hat sich diese Technik als sinnvoll erwiesen und es konnten bessere Ergebnisse als mit Baumwolltupfern erzielt werden (Ball et al., 1988; LeBlanc et al., 2007). Als Gründe hierfür werden angesehen:

- Größere Gebiete des Endometriums werden erfasst
- Konzentration an Mikroorganismen durch die Zentrifugation

Eine Fortführung dieses Verfahrens ist die Uterus-Lavage (Dascanio, 2003). Dabei wird der Lavageschlauch, der eine aufblasbare Manschette enthält, in den Uterus eingeführt. Durch diesen wird ein Liter Kochsalzlösung in den Uterus geleitet. Anschließend wird von rektal der Uterus massiert, damit sich die Flüssigkeit gleichmäßig verteilt. Die Rückgewinnung und die Aufbereitung des Materials erfolgt wie bei der Aspirationstechnik. Allerdings muss bei diesen Spül-Verfahren der erhöhte zeitliche und materielle Aufwand berücksichtigt werden. Auch wird das Endometrium deutlich mehr irritiert als durch eine einfache Tupferprobenentnahme (Brook, 1992). Trotz allem wird die Verwendung eines herkömmlichen Baumwolltupfers für die simple und schnelle Kontrolle auf das Vorhandensein von neutrophilen Granulozyten als ausreichend angesehen (Brook, 1992).

Wenige Erkenntnisse liegen bisher über die Verwendung von Zytologie-Bürstchen zur Probenentnahme aus dem Uterus der Stute vor. Hierbei handelt es sich um speziell für Zellabstriche entwickelte Bürstchen mit feinen Haaren, die auf einer schmalen Drahtspirale befestigt sind. Das kraniale Ende ist mit einer kleinen Plastikkappe geschützt. In der Humanmedizin sind sie schon lange erprobt und werden zur Entnahme von Endozervikalzytologien bei der Frau für geeigneter als Baumwolltupfer gehalten (Trimbos und Arentz, 1985).

Bourke et al. (1997) konnten in einem Vergleich mit Baumwolltupfern zur Entnahme von Endometriumszytologien bei der Stute nachweisen, dass die Bürstchen mehr auswertbare Zellen pro Gesichtsfeld liefern, zudem ist die Anzahl an deformierten

Zellen signifikant geringer. Bezüglich der Anzahl an neutrophilen Granulozyten konnten aber keine relevanten Unterschiede festgestellt werden.

Breitere Anwendung findet dieses Entnahmesystem in der Rinderpraxis, wo sich diese Methode bereits etabliert hat (Kasimanickam et al., 2005; Raab, 2004). Barlund et al. (2008) konnten mit einem CytoBrush zuverlässiger eine Endometritis diagnostizieren als mittels Vaginoskopie, Ultrasonographie und uteriner Lavage zur Gewinnung von zytologischem Material. Sie halten den CytoBrush für die zuverlässigste Methode zur Endometritis-Diagnostik beim Rind.

2.3.3 Probenaufbereitung

Die weitere Aufbereitung der Proben läuft bei allen Systemen ähnlich ab. Nach der Gewinnung des Probenmaterials wird dieses auf einem Objektträger ausgestrichen. Danach werden die Präparate für einige Minuten luftgetrocknet (Knudsen, 1964; Mattos et al., 1984; La Cour und Sprinkle, 1985; Brook, 1985). Ein längeres Lufttrocknen kann zu Zelldeformationen führen. Diese äußern sich in einer Vergrößerung der Zellen, ferner lässt die Affinität der Zellorganellen für die Färbestoffe nach. So wird die Interpretation der Ausstriche unnötig erschwert (Couto und Hughes, 1984). Dascanio (2003) beschreibt in diesem Zusammenhang Degenerationserscheinungen an den Zellkernen. Ley (1986) teilt diese Auffassungen nicht. Nach seinen Beobachtungen lassen sich Zytologien, die erst 48 Stunden nach der Entnahme fixiert und gefärbt wurden, problemlos auswerten. Er konnte keine nennenswerten Qualitätsbeeinträchtigungen bei der Zellmorphologie und Anfärbung feststellen. Dascanio et al. (1997) fixieren Proben nur dann umgehend, wenn abzusehen ist, dass die Proben erst nach mehr als 24 Stunden gefärbt werden können. Die Fixierung erfolgt in der Regel mit handelsüblichen Fixations sprays oder hochprozentigen Ethanolgemischen.

Für die Färbung der Ausstriche stehen mehrere Methoden zur Auswahl. Die ersten Untersuchungen wurden in den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts von Knudsen (1964) mit einer Orcein-Färbung durchgeführt.

Etabliert hat sich später Sano's Modifikation der Pollack's Trichrome Methode (Wingfield Digby, 1978; Wingfield Digby und Ricketts, 1982). Ursprünglich stammt

Literatur

dieses Färbeverfahren aus dem Gebiet der Inneren Medizin bei Pferden, wo es zur Anfärbung von Peritonealflüssigkeit genutzt wird. Geschätzt wird an diesem Verfahren die genaue Darstellung von Zelldetails, womit sich auch eng zusammenliegende Zellen innerhalb einer Zellgruppe noch gut differenzieren lassen (Freeman et al., 1986). Eingeschränkt wird die Anwendung allerdings durch die lange Färbedauer von vierzig Minuten.

Eine schnell und einfach durchführbare, zudem noch gute Ergebnisse liefernde Methode ist die Diff-Quick-Färbung[®] (Couto und Hughes, 1984; Brook, 1992; Walter et al., 2006; Riddle et al., 2007). Diese Vorteile haben dazu geführt, dass sie mittlerweile in der Praxis routinemäßig eingesetzt wird.

Die von Tillman und Meinecke (1980) erfolgreich angewandte Färbung nach Schorr, modifiziert nach Pundel, hat keine breite Anwendung gefunden.

Die Anfertigung eines separaten zweiten Ausstriches ermöglicht es, weiterführende Diagnostik zu betreiben, bevor die Ergebnisse von häufig parallel entnommenen bakteriologischen Proben vorliegen (Dascanio, 2003). Auf diesem könnten dann Spezialfärbungen für den Nachweis von Bakterien, Bakterienkapseln und Pilzen durchgeführt werden (Couto und Hughes, 1984).

Mit einer Gram-Färbung lassen sich Bakterien auch bereits auf einem zytologischen Ausstrich nachweisen und grob differenzieren (Pohl et al., 1977; Shin et al., 1979; Dascanio, 2003). Zum Nachweis der Bakterienkapsel beim Verdacht auf eine Klebsiellen-Infektion kann auf die Methylenblau-Färbung zurückgegriffen werden (Platt et al., 1976).

2.4 Interpretation der exfoliativen Endometriumszytologie bei der Stute

2.4.1 Mikroskopische Untersuchung

Die Auswertung und Interpretation der zytologischen Ausstriche erfolgt unter einem herkömmlichen Lichtmikroskop. Dabei werden die Proben zuerst mit einer geringen Vergrößerung betrachtet. So lässt sich feststellen, wie und in welcher Anordnung die Zellen auf dem Objektträger verteilt und ob überhaupt genügend Zellen für eine aussagekräftige Analyse vorhanden sind (Dascanio et al., 1997).

Beobachtungen von Brook (1992), wonach insbesondere junge Stuten sowie Maidenstuten eine höhere Anzahl an Zellen im Ausstrich aufweisen, werden von anderen Autoren nicht bestätigt. Vielmehr berichten Riddle et al. (2007), dass gerade bei Maidenstuten vermehrt Zytologien mit einer nicht ausreichenden Zellanzahl entnommen werden. Ein Grund sei die bei Maidenstuten oftmals noch nicht ausreichend relaxierte Zervix, so dass die Probe dann eher zervikalen anstelle uterinen Ursprungs sei. Desweiteren sei die uterine Sekretion bei diesen Stuten niedriger.

Falls nur sehr wenige Zellen von der entnommenen Probe auf den Objektträger übertragen werden konnten, ist es schwierig bis unmöglich, eine korrekte Beurteilung durchzuführen. Da viele Interpretationen auf einer Berechnung des Verhältnisses zwischen der Anzahl an Endometriumszellen und der an neutrophilen Granulozyten beruhen, kann dieses bei ungenügender Zellanzahl nicht richtig aufgestellt werden (Dascanio et al., 1997). Solche geringzelligen (Riddle et al., 2007) Proben müssen wiederholt werden, da sie den Zustand des Endometriums nicht repräsentativ widerspiegeln (Dascanio, 2003).

Für die genauere Interpretation werden höher auflösende Vergrößerungen gewählt. Einige Autoren empfehlen die 100fache Vergrößerung (LaCour und Sprinkle, 1985; Dascanio, 2003), bei der geübte Untersucher bereits die einzelnen Zelltypen differenzieren können (Couto und Hughes, 1984). Spätestens mit 400facher Vergrößerung sollte eine genaue Analyse kein Problem mehr darstellen. Es kann auch mit 1000facher Vergrößerung unter Öl-Immersion gearbeitet werden (Riddle et al., 2007).

2.4.2 Endometriumszellen

Die dominierende Zellpopulation im endometrialen Ausstrich wird von den Endometriumszellen gestellt. Die Morphologie dieses Zelltyps unterliegt sowohl jahreszeitlichen als auch zyklusbedingten Schwankungen.

Erste Untersuchungen auf diesem Gebiet wurden von Knudsen (1964) vorgenommen. Er versuchte den einzelnen Zyklusabschnitten spezifische Erscheinungsformen der Endometriumszellen zuzuordnen. Dabei konzentrierte er

Literatur

sich vor allem auf die Form der Zellkerne. Er beschreibt sie im Anöstrus und Diöstrus als schmal, rundlich und ebenso wie das Zytoplasma nur schwach angefärbt. Im Proöstrus und insbesondere zum Östrus hin werden diese runder und größer, zudem färbt sich auch das Zytoplasma stärker an. Nach der Geburt und im Diöstrus seien viele Mitosefiguren und verschiedene Kernformen zu sehen. Sowohl große blasse, als auch geschrumpfte Kerne sollen vorkommen. Diese Ansicht der strikten Zuteilung von verschiedenen Zellerscheinungsformen zu den einzelnen Zyklusabschnitten wird von anderen Autoren nicht geteilt (Freeman et al., 1986).

Freeman et al. (1986) ordnen die Zellbilder verschiedenen jahreszeitlichen Perioden zu, die den Phasen der Zuchtsaison bei der Stute in etwa entsprechen. Dabei entspricht die inaktive Phase dem saisonalen Anöstrus, die Übergangs-Phase der Frühlings- und Herbstzeit, während die aktive Phase den Zeitraum mit einem regelmäßigen Zyklusgeschehen widerspiegelt.

In der inaktiven Phase, deren Zellbild auch bei sexuell unreifen Stuten sowie Stuten mit eingeschränkter Ovarfunktion gefunden wird, haben die Endometriumszellen eher eine kubische, zuweilen auch geringfügig säulenartige Form. Das Zytoplasma erscheint homogen und ist wenig vakuolisiert (Brook, 1992; Liu, 1988). Die kubische Form wird auch von anderen Autoren übereinstimmend dem Anöstrus zugeordnet (Crickmann und Pugh, 1986; Liu, 1988; Brook, 1992).

Außerhalb des Östrus lagert sich ein Großteil der Endometriumszellen oft in Gruppen zusammen. In der Dorsalansicht ähneln diese überlappenden Zytoplasmagrenzen der Struktur einer Honigwaabe (Couto und Hughes, 1984) oder eines Mosaiks (Freeman et al., 1986).

Die Zellkerne erscheinen zu diesem Zeitpunkt oftmals „nackt“, womit gemeint ist, dass kein Zytoplasmasaum darstellbar ist (Freeman et al., 1986). Das Zytoplasma liegt meist neben den Kernen im Hintergrund und ist nur noch als feingranuliertes Material rund um den Nukleus darstellbar (Couto und Hughes, 1984). Die Zellkerne sind hypochromatisch, also ohne Chromatinpunktchen. Ihre Form ist ebenfalls kubisch (Crickman und Pugh, 1986; Dascanio, 2003) bis leicht säulenartig (Tillmann und Meinecke, 1980).

Eine weit verbreitet gegenteilige Auffassung ist, dass diese „nackten“ Kerne Artefakte sind, die durch mangelhafte Fixation oder Färbetechnik sowie durch fehlerhaftes Ausstreichen entstehen (Couto und Hughes, 1984; Dascanio, 2003).

Ebenfalls der inaktiven Phase des Endometriums wird das Auftreten von Endometriumzellen mit Zilienbesatz zugeordnet. Brook (1992) und Dascanio (2003) beschreiben das Vorkommen solcher Zellen vor allem im Diöstrus. Bei einem verkürzten Zyklus durch Prostaglandin $F_{2\alpha}$ -Applikation ist im darauffolgenden Östrus mit einem gehäuften Auftreten dieser „behaarten“ Zellen zu rechnen (Couto und Hughes, 1984; Dascanio, 2003). Die Zellen erscheinen säulenförmig, in der Diff-Quick-Färbung[®] ist das Zytoplasma leicht eosinophil angefärbt. Die basal gelegenen Zellkerne hingegen färben sich dunkel (Couto und Hughes, 1984). Zu beachten ist, dass die Zilien-Büschel sich während des Probenaufbereitungsprozesses ablösen und dann Artefakte bilden können (Dascanio, 2003).

In der Übergangsphase zwischen aktivem und inaktivem Zustand des Endometriums können zunehmend schlanke, längliche orange gefärbte Zellen mit am Zytoplasma anhaftenden Büscheln nachgewiesen werden. Interessanterweise konnten Freeman et al. (1986) diese Zellen während der aktiven Phase bei einigen Stuten nachweisen, die wiederholt nicht aufgenommen hatten. Dieses Phänomen wird von Ihnen als Hinweis auf hormonelle Imbalancen gesehen.

Im Anöstrus tauchen kubische Epithelzellen mit hypochromatischen Kernen und homogenen Zytoplasma auf (Freeman et al., 1986).

In der aktiven Phase nehmen die Endometriumzellen eine säulenförmige Form an (Couto und Hughes, 1984; Crickmann und Pugh, 1986; Freeman et al., 1986; Brook, 1992). Das Zytoplasma erscheint schaumig, was auf eine metabolische und sekretorische Aktivität schließen lässt (Tillmann und Meinecke, 1980; Brook, 1992). Dieser dort produzierte Mukus umgibt oftmals die Epithelzellen und kann im zytologischen Bild dargestellt werden. Nicht zu beobachten ist dieser Vorgang, wenn das Zellmaterial mittels einer Lavage-Technik gewonnen wurde (Brook, 1992). Die basophilen, ovalen Zellkerne der Epithelzellen zeigen jetzt punktförmige Chromatineinlagerungen und einen schmalen Nukleolus.

Literatur

Im Gegensatz zum Diöstrus kann kaum noch eine Gruppen- oder Nesterbildung beobachtet werden. Vielmehr liegen die Endometriumszellen nur noch in kleinen Gruppen beieinander, meist jedoch einzeln (Freeman et al., 1986; Brook, 1992). Trotz dieser vielen Beschreibungen ist es jedoch nicht möglich, aufgrund des Zellbildes eine genaue Zyklusstanddiagnose zu erheben (Dascanio, 2003).

Das Auftreten von schuppigen und squamösen Epithelzellen ist als Kontamination aus der Vagina oder Zervix zu werten, die meist im Zuge einer unsachgemäßen Probenentnahme entstehen. Regelmäßig können diese Zellen in Ausstrichen von Stuten post partum sowie Stuten mit Urinansammlungen im Uterus gefunden werden (Brook, 1992). Bei letzterer Dysfunktion finden sich zudem gelegentlich Zellen, die als „Chlorozyten“ bezeichnet werden (Freeman et al., 1986). In der Pollack's Trichrome Färbung sind sie von grünlicher Farbe und weisen intranukleäre Einschlusskörperchen auf.

Degenerationserscheinungen an den Epithelzellen können vielfältig ausgeprägt sein. Typische Anzeichen sind (Dascanio et al., 1997):

- Veränderungen an der Zellmembran
- Hypersegmentation des Kerns
- Vakuolenbildung
- Einschlüsse
- Tröpfchenbildung
- Unvollständige Zytoplasmaanfärbung
- Zellschwellung

Insbesondere der Zellkern reagiert empfindlich, wenn die Fixation nicht schnell genug erfolgt. Er verliert seine sphärische Form und die Affinität für Farbstoffe (Dascanio et al., 1997). Auch Couto und Hughes (1984) und Brook (1992) sehen Fehler bei der Fixation als Hauptursache für solche Degenerationserscheinungen. Weitere Gründe sind in einer rein mechanischen Beschädigung während des Entnahme- und Aufbereitungsprozesses (Couto und Hughes, 1984) oder als Folge chronischer Entzündungsprozesse zu sehen (Dascanio et al., 1997). Direkte charakteristische

Veränderungen durch Entzündungsprozesse sind jedoch nicht beschrieben (Couto und Hughes, 1984). Untersuchungen, nach denen degenerierte Epithelzellen gehäuft bei Stuten mit unterdurchschnittlicher Zuchtleistung auftreten (Solomon et al., 1972), konnten nicht bestätigt werden (Brook, 1992).

2.4.3 Neutrophile Granulozyten

Der am häufigsten nach den Endometriumszellen anzutreffende Zelltyp sind neutrophile Granulozyten.

Eine Entzündung des Endometriums wird durch die Präsenz von Entzündungszellen, insbesondere von neutrophilen Granulozyten, diagnostiziert. Die bei jeder entzündlichen Infiltration extravasal gelangenden Blutzellen sind im zytologischen Ausstrich gut nachweisbar (Tillmann und Meinecke, 1980). Eine erhöhte Anzahl dieses Zelltyps ist immer abnormal und zeigt zuverlässig eine Inflammation an (LaCour und Sprinkle, 1985).

Bereits wenige Stunden nach einer Bakterienaszension (Peterson et al., 1969) oder experimenteller Infusion von biologischen oder chemischen Substanzen in den Uterus (Williamson et al., 1983; Pycocock und Allen, 1989) können Entzündungszellen nachgewiesen werden. Die Dichte an neutrophilen Granulozyten lässt dabei einen Rückschluss auf die Stärke des Entzündungsprozesses zu (Tillmann und Meinecke, 1980).

Unbestritten ist, dass das Vorkommen von zahlreichen neutrophilen Granulozyten ein sicherer Indikator dafür ist, dass die Stute an einer Endometritis leidet (Knudsen, 1964; Asbury, 1984a; Roszel und Freeman, 1988). Schwieriger ist allerdings die Interpretation, wenn nur wenige neutrophile Granulozyten im Ausstrich gefunden werden.

In der Literatur finden sich zahlreiche Richtlinien für die Interpretation des Nachweises von neutrophilen Granulozyten in exfoliativen Endometriumszytologien von Zuchtstuten, um mittels semi-quantitativer Kriterien zu ermitteln, ob die Stute an einer Endometritis leidet oder nicht (Tabelle 3, Tabelle 4).

Literatur

Dafür wird in der mikroskopischen Untersuchung die Zahl der Entzündungszellen pro Gesichtsfeld gezählt. Allerdings gibt es deutliche Unterschiede in der Wahl der Vergrößerung sowie der eigentlichen Beurteilung.

Tabelle 3: Beurteilung der Endometriumszytologien von Stuten nach Anzahl der neutrophilen Granulozyten pro Gesichtsfeld (GF = Gesichtsfeld, PMN = neutrophile Granulozyten)

Vergrößerung	PMN/ GF	Grad-Einteilung	Beurteilung	Autor
100fach	1 - 3	+	Gering	Pohl et al., 1977
	3 - 5	++	Mäßig	
> 10	+++	Stark		
100fach	0 - 2	-	Normal	Riddle et al., 2007
	2 - 5		Mild	
	> 5		Schwer	
240fach	1/ 5	-	Positiv	Knudsen, 1964
400fach	1/ Ausstrich	-	Positiv	Wingfield Digby, 1978 Purswell et al., 1989 Mattos et al., 1984
400fach	> 5 / 10	-	Positiv	Dascanio, 2003
	0 /10	-	Negativ	Brook, 1985
	1 - 5/ 10	-	Zweifelhaft	
	5 / 10	-	Positiv	
	1 - 5/ 10	1	+/-	Lauer, 1977
	1	2	+	
	2 - 10	3	++	
10 - 30	4	+++		
> 30	5	++++		

Tabelle 4: Beurteilung der Endometriumszytologien von Stuten nach dem Verhältnis von neutrophilen Granulozyten zu Endometriumszellen (PMN = neutrophile Granulozyten, % = Prozent)

Vergrößerung	% - PMN	Beurteilung	Autor
400fach	0 - 3	-	Couto und Hughes, 1984
	3 - 10	+	
	10 - 15	++	
	15 - 30	+++	
	30 - 50	++++	
	50 - 75	+++++	
	> 75	++++++	
400fach	0	-	Ricketts und Mackintosh, 1987
	< 0,5	+/-	
	0,5 - 5	+	
	5 - 30	++	
	> 30	+++	
	> 2	Positiv	Ball et al., 1988
1000fach	< 5	Negativ	Card, 2005
	5 - 15	Mild	
	15 - 30	Moderat	
	> 30	Schwer	

Die Diagnose einer Endometritis stützt sich bei der zytologischen Untersuchung im Wesentlichen auf das Vorkommen und die Anzahl neutrophiler Granulozyten im Ausstrich. Da jedoch weiter kaudal gelegene Geschlechtsorgane wie Zervix, Vagina und Vestibulum physiologischerweise eine signifikant höhere Konzentration an neutrophilen Granulozyten aufweisen als das Endometrium (Aguilar et al., 2005), ist für eine korrekte Auswertung eine sorgfältige Probenentnahme unter Verwendung von geschützten Systemen essentiell. Ansonsten können Kontaminationen aus den Bereichen des kaudalen Geschlechtstraktes das Ergebnis verfälschen.

Bei geschlechtsgesunden Stuten sollten im Östrus keine neutrophilen Granulozyten im zytologischen Ausstrich zu detektieren sein (Wingfield Digby und Ricketts, 1982;

Literatur

Crickmann und Pough, 1986). Ebenso konnten Kotilainen et al. (1994) während des Östrus mittels Low-Volume-Uterine-Lavage keine neutrophilen Granulozyten gewinnen. Das Vorkommen von minimalen Infiltraten mit neutrophilen Granulozyten im Uterus gesunder Stuten wird jedoch auch als physiologisch beschrieben (Knudsen, 1964; Brook, 1985). Weitere Angaben zum Gehalt an neutrophilen Granulozyten aus Abstrichen gesunder Endometrien schwanken zwischen 0,66 % (Aguilar et al., 2005) und 2 % bis zu vier Tagen nach der Ovulation (Card et al., 2004). Gehalte um die drei Prozent konnten bei Stuten, die als nicht gefährdet für die Entwicklung einer post-breeding-induced-endometritis eingestuft wurden, nachgewiesen werden (Nikolakopoulos und Watson, 2000). Ein vereinzelt Auftreten von neutrophilen Granulozyten ist für den ersten Östrus nach dem saisonalen Anöstrus beschrieben (Wingfield Digby und Ricketts, 1982).

Eine diskrete bis moderate Erhöhung der Anzahl neutrophiler Granulozyten kann in den ersten Tagen *post partum* beobachtet werden (Wingfield Digby und Ricketts, 1982; Brook, 1985; Crickmann und Pough, 1986), wenn die Selbstreinigungs- und Involutionvorgänge ablaufen (Mattos et al., 1984). Dieser Vorgang sollte allerdings spätestens nach neun Tagen abgeschlossen sein (Crickmann und Pough, 1986) und keine neutrophilen Granulozyten im Ausstrich mehr gefunden werden.

Erhöhte Anzahlen an Entzündungszellen werden ebenso vier bis sieben Tage nach einem natürlichen Deckakt als problemlos eingestuft (Wingfield Digby, 1978; Wingfield Digby und Ricketts, 1982). Neben den während des Deckaktes in den Uterus gelangenden Bakterien induzieren zusätzlich auch die Spermien (Kotilainen et al., 1994) und beim Deckakt gesetzte kleine Traumata eine Entzündung des Endometriums (Couto und Hughes, 1984).

Wichtige Informationen liefert die Auswertung endometrialer Abstriche bei der Beurteilung der Ergebnisse einer parallel durchgeführten bakteriologischen Untersuchung. Die zytologische Auswertung sollte die Grundlage für die Beurteilung der Infektiosität der bei der bakteriellen Untersuchung ermittelten Keime darstellen (Tillmann und Meinecke, 1980). Die Zytologie als direktes Nachweisverfahren vermag genitale Störungen sogar empfindlicher aufzudecken als eine bakterielle Untersuchung (Mattos et al., 1984).

Geht ein Bakteriennachweis nicht mit Entzündungsanzeichen einher, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um eine opportunistische Keimbesiedlung handelt (Witherspoon et al., 1972), welche die Funktion der Genitalschleimhäute nicht beeinträchtigt (Tillmann und Meinecke, 1980). Neben einer symptomlosen Keimbesiedlung sind sekundäre Kontaminationen während des Entnahmeproganges der häufigste Grund für eine falsch positive Probe. In diesem Fall wäre die bakteriologische Untersuchung positiv und die zytologische Untersuchung negativ. Da sich selbst bei klinisch genitalgesunden Stuten Keime nachweisen lassen (Hinrichs et al., 1988; Klein et al., 2009), ist laut Dascanio et al. (1997) ein negativer Zytologie-Ausstrich besser als eine bakteriologische Untersuchung dazu geeignet, eine Stute unbedenklich zum Zuchteinsatz freizugeben. Eine Stute mit einem negativen Befund in der bakteriologischen Untersuchung und einem unauffälligen Zellbild im Ausstrich wird folgerichtig als genitalgesund angesehen (Brook, 1985).

Ein Befall mit pathogenen Erregern hingegen geht fast immer mit einer erhöhten Anzahl an neutrophilen Granulozyten einher (LaCour und Sprinkle, 1985). Die Korrelation bei bakteriologisch nachgewiesener Endometritis zwischen dem Ergebnis der bakteriologischen Untersuchung und dem Nachweis von Entzündungszellen wurde wiederholt gezeigt und liegt in Bereichen zwischen 64 % (Riddle et al., 2007) und 80 % (Knudsen, 1964; Wingfield Digby und Ricketts, 1982; LaCour und Sprinkle, 1985; Brook, 1985; Waelchi et al., 1988; Reinemund, 1988). Der Nachweis von fakultativ pathogenen Erregern in der bakteriologischen Untersuchung, kombiniert mit einem überwiegend durch Entzündungszellen geprägten zytologischem Bild gilt als sicheres Indiz für eine schwere Infektion des Endometriums (Brook, 1992).

Das Ergebnis der bakteriologischen Untersuchung liegt frühestens nach 24 bis 48 Stunden vor, wohingegen der zytologische Befund bereits am selben Tag verfügbar ist. So kann schon vor dem Erhalt des bakteriellen Befundes eine fundierte Entscheidung getroffen werden, ob die Stute zur Bedeckung zugelassen wird oder nicht (Knudsen, 1982; Couto und Hughes, 1984). Falls erforderlich, kann bereits mit einer unspezifischen Therapie zur Steigerung der uterinen Abwehrleistung begonnen werden (Walter und Wehrend, 2007, 2009). Berücksichtigt werden muss jedoch, dass es auch zu falsch negativen Proben kommen kann. Die bakteriologische Untersuchung wäre dann negativ, die zytologische Untersuchung positiv (Wingfield Digby, 1978; Brook, 1985; Brook, 1992). Mögliche Gründe hierfür sind:

Literatur

- Anwesenheit von antimikrobiellen Substanzen im Uterus
- Nichtinfektiöse Irritationen
- *post partum*: bis zu 9 Tage *post partum* ist eine moderate Erhöhung der Anzahl neutrophiler Granulozyten physiologisch (Crickmann und Pough, 1986)
- Nach Bedeckung/ Besamung: bis zu 96 Stunden *post inseminationem* gelten < 5 % neutrophile Granulozyten als physiologisch (Card, 2005)

Werden bei einem positiven zytologischen Befund keine Mikroorganismen in der bakteriologischen und mykologischen Untersuchung gefunden, kann dies auf eine *Endometritis sicca* hindeuten, eine chronische, nicht eitrige Entzündung des Endometriums. Sie stellt bei circa 15 % der güstern Zuchstuten die Ursache für Fertilitätsstörungen dar (Walter und Wehrend, 2007).

Anhand der Morphologie der neutrophilen Granulozyten lässt sich ein Rückschluss auf die Art und die Schwere der endometrialen Entzündung ziehen. Bei schweren Infektionen zeigen sich karyolytische und karyorhektische Veränderungen an den Kernen der neutrophilen Granulozyten (Crickman und Pough, 1986; Brook, 1992), wie sie infolge einer septischen Entzündung durch bakteriellen Befall auftreten.

Bei nichtseptischen Entzündungen, wie nach intrauterinen Behandlungen, Bedeckung oder künstlicher Insemination finden sich dagegen intakte, hypersegmentierte neutrophile Granulozyten (LaCour und Sprinkle, 1985).

2.4.4 Andere Zelltypen

Makrophagen sind in endometrialen Abstrichen eher selten anzutreffen. Sie können mehrkernige Riesenzellen bilden. Die Kerne können runder, aber auch ovaler oder bohnenförmiger Gestalt sein. Das leicht bläuliche Zytoplasma ist häufig von Vakuolen durchsetzt (Dascanio, 2003). Meist sind sie bei chronischen Prozessen vorzufinden, in der Fohlenrosse gelten sie als Bestandteil von akuten Entzündungen (LaCour und Sprinkle, 1985). Üblicherweise ist ihr Vorkommen mit dem parallelen Auftreten von neutrophilen Granulozyten und Erythrozyten vergesellschaftet (Brook, 1992).

Lymphozyten sind ebenfalls selten nachzuweisen (Wingfield Digby, 1978; Dascanio, 2003). Ihr gehäuftes Auftreten deutet auf chronische Entzündungsprozesse hin. Sie sind zumeist kleiner als neutrophile Granulozyten und besitzen sehr wenig bläulich schimmerndes Zytoplasma. Die Unterscheidung von neutrophilen Granulozyten kann jedoch Schwierigkeiten bereiten (Brook, 1985). Wenn sie den dominierenden Zelltyp in einem Ausstrich darstellen, wird das mit einer Lymphstauung des Endometriums assoziiert (Couto und Hughes, 1984; Dascanio, 2003). Knudsen (1964) beschreibt ein gehäuftes Auftreten im Diöstrus.

Plasmazellen, die mit gewisser Frequenz in Ausstrichen vorkommen, konnten außer im Rahmen von chronischen Entzündungen (Dascanio, 2003) nicht mit speziellen klinischen Erscheinungen in Verbindung gebracht werden (LaCour und Sprinkle, 1985).

Nur gelegentlich lassen sich eosinophile Granulozyten finden. Sie werden in Zusammenhang mit einer Pneumovagina gebracht, die zu einem Pneumouterus führen kann. Begünstigend hierauf scheinen sich eine abnormale Vulvastellung sowie ein schwacher Analmuskel-Tonus auszuwirken (Slusher et al., 1984). Stuten, denen künstlich Luft in den Uterus insuffliert wurde, reagierten ebenfalls mit einer verstärkten Extravasation von eosinophilen Granulozyten (Slusher et al., 1984).

Der massenhafte Nachweis von Erythrozyten kann von medizinischer Relevanz sein, da Blut in größeren Mengen spermienfeindlich ist und somit die Befruchtungserfolge beeinträchtigt. Möglicherweise ist es aber auch ein Hinweis auf eine schwere Entzündung (Wingfield Digby, 1978). Als physiologisch werden größere Mengen im frühen postpartalen Zeitraum angesehen (Crickman und Pough, 1986). Ebenso führt die Hyperämie im Östrus zu einer zunehmenden kapillären Instabilität, wodurch auch vermehrt Erythrozyten aus den Gefäßen ins Gewebe übertreten und dann im Ausstrich sichtbar werden (Couto und Hughes, 1984). Meist sind sie jedoch auf ein entnahmebedingtes Trauma zurückzuführen (Wingfield Digby, 1978).

3 Material und Methode

3.1 Probanden

Die Untersuchungen fanden in der Zuchtsaison 2008 von Anfang März bis Anfang August statt.

Sämtliche untersuchte Stuten waren zur instrumentellen Besamung auf dem Gestüt Birkhof, 73072 Donzdorf aufgestellt. Insgesamt wurden 233 verschiedene Stuten in die Studie aufgenommen, von denen einige jedoch mehrmals beprobt wurden. Somit ergab sich eine Gesamtzahl von 340 Stuten. Zum weitaus größten Teil handelte es sich hierbei um Warmblutstuten (n = 337), vereinzelt auch um Vollblutstuten (n = 3). Das Alter der Tiere lag zwischen 2 und 23 Jahren (Durchschnitt 11,8 Jahre). Weitere Angaben zu dem Patientenkollektiv finden sich in Tabelle 5.

Tabelle 5: Anamnestische Angaben zu den untersuchten Stuten

Stuten	Alter 2 - 10 Jahre	Alter 11 - 17 Jahre	Alter 18 - 23 Jahre	Gesamt - anzahl
Maidenstuten	61	21	1	83
Fohlenführende Stuten	16	19	8	43
Güste Stuten	21	74	29	124
Stuten mit Trächtigkeits- problemen	7	30	5	42
Ein- oder mehrjährig nicht besamte Stuten	8	38	2	48

3.2 Versuchsgruppen

3.2.1 Versuch A: Vergleich des bakteriologischen Befundes mit dem zytologischen Befund

Sämtliche Stuten, denen eine Tupferprobe zur bakteriologischen Untersuchung entnommen wurde, wurden diesem Versuch zugeordnet. Als Indikation für eine solche Untersuchung galt:

- Kontrolltupfer vor der instrumentellen Besamung
- Wiederholtes Umrossen
- Kontrolltupfer nach abgeschlossener antibiotischer Behandlung aufgrund des Nachweises von fakultativ pathogenen Keimen in vorangegangenen bakteriologischen Untersuchungen
- Auffällige Befunde im Rahmen der gynäkologischen Untersuchung

Die Probenentnahme für die bakteriologischen Untersuchungen erfolgte entweder mittels eines Knudsen-Katheters (Fa. Laborgeräte Reinke, Gießen) oder mit einem Uteruskulturtupfer für Stuten (Fa. Minitüb, Tiefenbach).

Zur Entnahme des Materials für die zytologische Untersuchung wurden drei verschiedene Entnahmesysteme verwendet, mit denen jeweils an einem Drittel der Probanden die Proben entnommen wurden. Zum Einsatz kamen der Knudsen-Katheter, der Uteruskulturtupfer sowie CytologyBrushes[®] für Stuten (Fa. Minitüb, Tiefenbach). Ausgewertet wurde hierbei, welches Zytologie-Entnahmesystem die beste Korrelation zum bakteriologischen Ergebnis erbringt.

In diesem Versuchsteil wurden insgesamt 279 bakteriologische Proben entnommen. Zudem erfolgte zeitgleich die Entnahme von Endometriumszytologien mit mindestens einem, meist jedoch zwei verschiedenen Entnahmesystemen. Die auswertbaren zytologischen Proben verteilten sich wie folgt:

- Knudsen-Gruppe: Entnahme der Zytologien mittels Knudsen-Katheter
n = 120

Material und Methode

- Brush-Gruppe: Entnahme der Zytologien mittels CytologyBrush[®]
n = 160
- Tupfer-Gruppe: Entnahme der Zytologien mittels Uteruskulturtupfer
n = 119

Die Tupferprobe für die bakterielle Untersuchung wurde vorzugsweise im Östrus entnommen, vereinzelt auch im Diöstrus.

3.2.2 Versuch B: Vergleich dreier Zytologie-Entnahmesysteme

Die Entnahme der zytologischen Abstriche erfolgte ebenfalls mit dem Knudsen-Katheter, dem Uteruskulturtupfer sowie dem CytologyBrush[®]. Zum Vergleich der verschiedenen Entnahmesysteme wurden bei einer Stute mindestens zwei Entnahmesysteme gleichzeitig angewandt und die Ergebnisse miteinander verglichen.

In diesem Versuchsteil wurden insgesamt 318 Proben entnommen, die sich wie folgt verteilen:

- Gruppe 1: Vergleich Knudsen-Katheter mit CytologyBrush[®]
n = 110
- Gruppe 2: Vergleich Knudsen-Katheter mit Uteruskulturtupfer
n = 90
- Gruppe 3: Vergleich CytologyBrush[®] mit Uteruskulturtupfer
n = 118

Die Zuteilung in den Versuchsteil B erfolgte zum Teil automatisch durch die Probenentnahme für die zytologische Untersuchung in Versuchsteil A. Hierbei wurde in der Regel mindestens ein weiteres Entnahmesystem zusätzlich angewandt. Dies bedeutete nur einen geringfügigen Mehraufwand und ließ sich arbeits- und zeittechnisch sinnvoll miteinander kombinieren.

Desweiteren war es durch die Verwendung von einzeln abgepackten, autoklavierten Objektträgern (76 × 26 mm, Fa. iDL, Nidderau) möglich, Proben von einer Stute sowohl für den Versuchsteil A, als auch für den Versuchsteil B zu nutzen.

3.3 Untersuchungsverfahren

3.3.1 Gynäkologische Untersuchung

Vor der Probenentnahme wurde von allen Tieren der Vorbericht über den Reproduktionsstatus erfasst und diese anschließend einer gynäkologischen Untersuchung unterzogen. Diese bestand aus einer Kontrolle der Verhaltensrosse an einem Abprobierhengst (ausgenommen Stuten, die ein Fohlen bei Fuß führten), einer Adspektion der äußeren Geschlechtsorgane, sowie einer rektalen palpatorischen und ultrasonographischen (Logiq 100 ProVet, 5,0 MHz Linearschallkopf) Untersuchung des Uterus und der Ovarien. Für die innere Untersuchung wurde ein Einmalrektalhandschuh (Fa. Müller, Nürnberg) mit Gleitgel (WDT, Garbsen) verwendet. Die erhobenen Daten und Parameter sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Datenerhebung im Rahmen der gynäkologischen Untersuchung

Gynäkologische Untersuchung	Erfasste Daten
Anamnese	Alter Anzahl an Fohlen Datum der Geburt Dauer der Gützeit Trächtigkeitsstörungen Ergebnisse vorheriger bakteriologischer Untersuchungen Ergebnisse vorheriger Trächtigkeitsuntersuchungen Besonderheiten

Material und Methode

Gynäkologische Untersuchung	Erfasste Daten
Verhaltensrosse	Blitzen Dulden Harnen
Äußerlich sichtbarer Vaginalausfluß	Vorhanden Nicht vorhanden
Uterus	Flüssigkeitsansammlungen Uterus-Zysten Uterines Ödem Lage Tonisierung Symmetrie
Ovarbefunde	Größe Größe des dominanten Tertiärfollikels (in cm) Corpus luteum

Als güst wurden solche Stuten bezeichnet, die vorberichtlich aus einer Besamung/Bedeckung in der vorherigen (oder noch weiter zurückliegenden) Zuchtsaison kein positives Trächtigkeitsergebnis aufweisen konnten. Wenn trotz positiver Trächtigkeitsuntersuchung dennoch kein lebendes Fohlen geboren werden konnte (Fruchtresorption, Abort), so wurde dies unter dem Punkt Trächtigkeitsstörungen vermerkt.

Die Einteilung der Stuten in die verschiedenen Zyklusstadien Fohlenrosse, Östrus und Diöstrus erfolgte anhand der Ergebnisse aus der Kontrolle der Verhaltensrosse (ausgenommen Stuten, die ein Fohlen bei Fuß führten), sowie der rektalen palpatorischen und ultrasonographischen Untersuchung. Als östrisch zählten Stuten, die entweder eine positive Verhaltensrosse am Hengst zeigten, oder neben einem Follikel von über 3 cm im Diameter zusätzlich eine Ödematisierung des Uterus aufwiesen (Handler und Aurich, 2005). Der Grad der Ödematisierung wurde folgendermaßen dokumentiert:

- - = kein endometriales Ödem
- + = geringgradig ausgeprägtes endometriales Ödem
- ++ = mittelgradig ausgeprägtes endometriales Ödem
- +++ = hochgradig ausgeprägtes endometriales Ödem, deutliche Radspeichen-Struktur

Flüssigkeitsansammlungen im *Cavum uteri* von weniger als 2 cm Höhe wurden als geringgradig, von über 2 cm Höhe als mittel-hochgradig eingestuft (Brinsko et al., 2003).

3.3.2 Trächtigkeitsuntersuchung

Die Trächtigkeitsuntersuchung erfolgte 16 - 18 Tage nach der letzten Besamung entweder auf dem Gestüt, oder das Ergebnis wurde, bei Untersuchung durch den Haustierarzt, telefonisch vom Besitzer erfragt.

Die Diagnose einer Trächtigkeit wurde gestellt, wenn eine Asymmetrie und Kontraktilität der Gebärmutter vorlag und zudem ultrasonographisch eine hypoechogene Fruchtanlage festgestellt werden konnte.

Erfolgte die erste Besamung später als 25 Tage nach der bakteriologischen / zytologischen Probenentnahme, so wurden diese Stuten bei der Untersuchung der Einflussfaktoren auf die Trächtigkeitsrate nicht berücksichtigt. Gründe für solch lange Zeitabstände waren:

- Rosse ausschließlich zur Behandlung genutzt
- Stute hatte zum Zeitpunkt der Probenentnahme bereits ovuliert
- Keine Follikelweiterbildung

Stuten, bei denen die zytologische Probe *post inseminationem* entnommen wurde, wurden ebenfalls von dieser Untersuchung ausgeschlossen.

Material und Methode

3.3.3 Entnahmetechnik für die bakteriologische Untersuchung

Vor jeder Probenentnahme wurde das äußere Genitale zuerst trocken, dann mit einer desinfizierenden Lösung (Cutasept[®], Bode Chemie GmbH, Hamburg) und abschließend nochmal trocken gereinigt. Für die Probenentnahme wurden zwei verschiedene bedeckte Tupfersysteme genutzt.

Zum einen wurde der sterilisierbare Knudsen-Katheter verwendet (Abbildung 1). Dabei handelt es sich um einen länglichen Metallstab mit einer verschiebbaren Metallspirale. An deren Ende befinden sich Ausbohrungen, in die Baumwollfädchen für die bakteriologische Untersuchung gezogen werden können, während von der Spirale das Material für die zytologische Untersuchung entnommen wird. Der Katheter wurde geschlossen unter Handschutz durch den Zervikalkanal in das *Cavum uteri* eingeführt, dort dann der innere Tupferträger vorgeschoben und anschließend für 30 Sekunden in Kontakt mit dem Endometrium gebracht. Nach Verschließen des Katheters durch vorheriges Zurückziehen des inneren Metallstabes konnte er dann entnommen werden, wobei darauf zu achten war, dass das Verschließen vollständig erfolgte, um Kontaminationen aus Vagina und Zervix zu verhindern. Das Baumwollfädchen wurde dann mit einer sterilen Pinzette entnommen und in ein Röhrchen mit steriler Kochsalzlösung verbracht.



Abbildung 1: Inneres Kompartiment des Knudsen-Katheters mit Metallspirale zur Aufnahme von Zellmaterial

Als zweites Entnahmesystem wurde ein doppelt geschützter Uteruskulturtupfer für Stuten (Fa. Minitüb, Tiefenbach) angewandt (Abbildung 2). Diese waren einzeln verpackt. Die äußere Hülle wurde unter manueller Kontrolle in die Zervix eingeführt, dort die innere Hülle durch die blaue Kappe gestoßen und anschließend der

Wattetupfer in die Gebärmutter vorgeschoben. Der Kontakt mit dem Endometrium erfolgte ebenfalls über 30 Sekunden, das Zurückziehen dann in umgekehrter Reihenfolge des oben beschriebenen Einfuhrprozesses. Nach der Entnahme aus dem Uterus wurde die Außenhülle entfernt und der Tupfer aus der Innenhülle in ein AMIES[®]-Transportmedium (MEUS S.r.l., Piove di Sacco, Italien) verbracht.



Abbildung 2: Uteruskulturtupfer für Stuten

Zur Diagnostik wurden die Tupfer an folgende Einrichtungen verschickt:

- Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart –Bakteriologie-Schaflandstraße 3/3, 70736 Fellbach
- Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus–Liebig–Universität–Gießen, Frankfurterstraße 85-89, 35392 Gießen

3.3.4 Entnahmetechnik für die zytologische Untersuchung

Die Entnahme der Proben für die zytologische Untersuchung mittels Knudsen-Katheter und Uteruskulturtupfer erfolgte auf gleiche Weise wie für die bakteriologische Untersuchung.

Bei der Entnahme mittels Knudsen-Katheter wurde das an der Metallspirale anhaftende Zellmaterial vorsichtig auf einen Objektträger (76 × 26 mm, VWR[®], Darmstadt) übertragen. Bei der Verwendung des Uteruskulturtupfers wurde der Wattetupfer in horizontalen Bahnen mit gleichmäßigem Druck auf einem Objektträger (76 × 26 mm, VWR[®], Darmstadt) ausgerollt. Falls der Wattetupfer noch zur

Material und Methode

bakteriologischen Untersuchung weitergeleitet werden sollte, wurden sterile Objektträger (76 × 26 mm, Fa. iDL, Nidderau) verwendet.

Als drittes System wurde der CytologyBrush[®] (Fa. Minitüb, Tiefenbach) angewandt (Abbildung 3). Der CytologyBrush[®] besteht aus einer Bürste, welche die Zellen aus dem Uterus aufnimmt, sowie einer Hülle, die die Bürste beim Einführen schützt und dafür sorgt, dass nur Zellen aus dem Uterus und nicht aus dem Zervikalkanal entnommen werden. Zur Einführung des CytologyBrush[®] in den Uterus wurde die äußere Hülle des Uteruskulturtupfers genutzt.

Die Hülle des Brushes wurde bis zur ersten Rasterung vorgeschoben, wodurch sich die blaue Kappe der äußeren Hülle öffnete. Die Bürste wurde dann in den Uterus vorgeschoben und die Zellen durch vorsichtiges Drehen an dem Stab, auf dem das Bürstchen befestigt war, aufgenommen. Anschließend wurde die Bürste in die Umhüllung zurückgezogen und das gesamte Gerät aus dem Genitaltrakt entfernt. Danach erfolgte die Übertragung des Zellmaterials von der Bürste auf den Objektträger, indem der Brush ebenso wie der Wattetupfer mit sanftem Druck auf dem Objektträger ausgerollt wurde.



Abbildung 3: CytologyBrush[®] für Stuten

3.3.5 Probenaufbereitung für die zytologische Untersuchung

Nach dem Ausstreichen auf einem Objektträger wurden die exfoliativen Endometriumszytologien für einige Minuten luftgetrocknet.

Das weitere Vorgehen bestand aus der Fixation sowie der Färbung der Präparate mit einer Schnellfärbemethode mit Eosin und Thiazin. Hierfür wurde das Hemacolor[®]-Färbeset (Fa. Merck, Darmstadt), welches auf der molekularen Wechselwirkung

zwischen Eosin G und einem Azur B-DNA-Komplex beruht, verwendet. Durch eine Mischung des kationischen Farbstoffes Azur B (entsteht durch Demethylierung aus Methyleneblau) mit dem anionischen Farbstoff Eosin entsteht der sogenannte Romanowsky-Giemsa-Effekt. Diese Methode wird üblicherweise zur Färbung von Blutausstrichen verwendet, dort erscheinen Kerne rot bis violett, die Granula von neutrophilen Granulozyten hellviolett. Bei der Färbung von exfoliativen Endometriumszytologien stellen sich die Zellen wie in Abbildung 4 zu sehen dar.

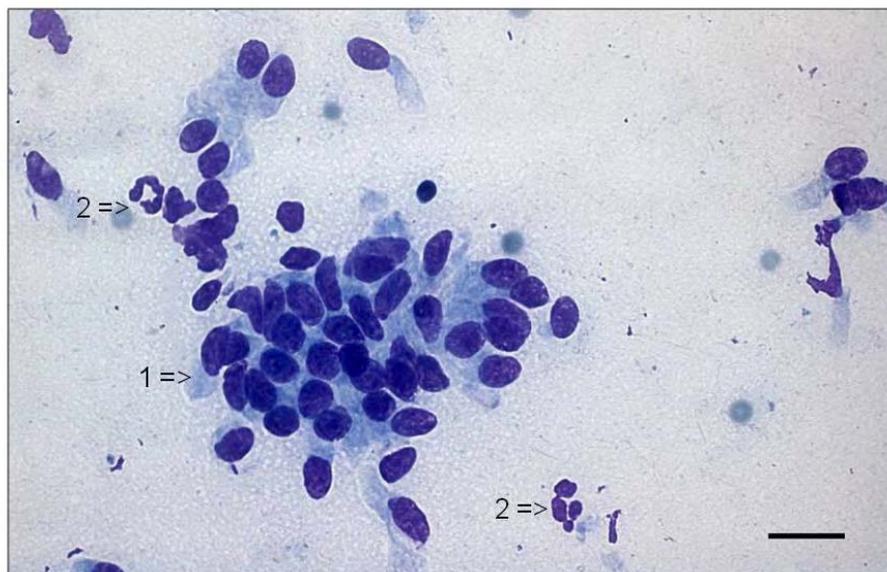


Abbildung 4: Exfoliative Endometriumszytologie von einer Stute im Östrus, mit Endometriumszellen (1) und zwei neutrophilen Granulozyten (2), Entnahme mit CytologyBrush[®], Eosin-Thiazin-Färbung, Balkenlänge 20 µm

Die Objektträger wurden dazu mehrmals in die Behältnisse mit der jeweiligen Lösung getaucht (Tabelle 7). Anschließend wurde auf der Unterseite des Objektträgers (die Seite, auf der sich keine Zellen befanden) die Färbelösung vorsichtig mit Leitungswasser abgespült.

Tabelle 7: Hemacolor®-Färbung

Bezeichnung	Inhalt	Anzahl Wiederholungen
Lösung 1	Fixierlösung	6 x 1 Sekunde
Lösung 2	Farbreagenz, rot	6 x 1 Sekunde
Lösung 3	Farbreagenz, blau	6 x 1 Sekunde

Anschließend wurden die Ausstriche erneut luftgetrocknet und ein Deckgläschen (24 x 50 mm, Fa. VWR®, Darmstadt) mit Hilfe eines Eindeckmittels (Entellan®, Merck, Darmstadt) für die Archivierung aufgeklebt.

3.4 Auswertung

3.4.1 Auswertung der bakteriologischen Untersuchung

Es wurden sämtliche von den beiden untersuchenden Einrichtungen isolierten Keimarten erfasst und dokumentiert. Die Stärke des bakteriellen Befalls wurde von beiden Einrichtungen gleichermaßen wie folgt angegeben (Tabelle 8):

Tabelle 8: Stärke des bakteriellen Befalls

Stärke	Befund
-	negativ
(+)	einige Einzelkolonien
+	geringer Keimgehalt
++	mittlerer Keimgehalt
+++	hoher Keimgehalt

Als fakultativ pathogene Spezies wurden angesehen (Pohl et al., 1977; Ricketts, 1981; Ricketts und Mackintosh, 1987; Hinrichs et al., 1988; Huchzermeyer, 2003):

- β -hämolyisierende Streptokokken
- *Escherichia coli*
- *Escherichia coli variatio haemolytica*
- *Klebsiella spp.*
- *Pseudomonas spp.*
- Pilze (Candida, Aspergillus, Mucor)
- Hefen

Als apathogene Spezies wurden gewertet:

- α -hämolyisierende Streptokokken
- γ -hämolyisierende Streptokokken
- anhämolysierende Streptokokken
- *Staphylococcus epidermidis*
- *Staphylococcus intermedius*
- aerobe Bazillen
- coliforme Keime
- *Enterococcus spp.*
- *Acinetobacter spp.*
- *Citrobacter spp.*
- *Corynebakterium spp.*
- *Micrococcus*
- *Alcaligenes*

Vom Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart –Bakteriologie- Schaflandstraße 3/3, 70736 Fellbach wurde der Nachweis von:

Material und Methode

- Klebsiellen
- *Escherichia coli variatio haemolytica*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Bordetella bronchoseptica*
- *Actinobacillus equuli*
- β -hämolsierende Streptokokken
- *Staphylococcus aureus*
- *Tylorella equigenitalis*

sowie ein hochgradiger Gehalt von *Pseudomonas spp.*, Hefen und Schimmelpilzen als fakultativ pathogen eingestuft.

Jegliche andere Befunde wurden anhand der Leitlinien „Sicherstellung eines Qualitätsmanagements in Besamungsstationen für Pferde“ (III. Hygieneempfehlung „Zulassung Stuten zur Zucht“ der Deutschen Reiterliche Vereinigung, 2002) als „Unspezifisches Keimwachstum“ eingestuft.

3.4.2 Lichtmikroskopische Auswertung der exfoliativen Endometriumszytologien

Die Beurteilung der Zytologien erfolgte mit Hilfe des Lichtmikroskops Ortholux II (Fa. Leica, Wetzlar).

Zu Beginn einer jeden Auswertung wurde der Ausstrich bei 200facher Vergrößerung großflächig hinsichtlich der Zellverteilung und der Zellmorphologie durchmustert. Die Beurteilung der Zellmorphologie wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

- Ausstrich gut auswertbar, keine oder nur geringe Deformationen
(< 10 % der Zellen deformiert)
- Ausstrich gut auswertbar, nur stellenweise starke Deformationen
(< 20 % der Zellen deformiert)

- Ausstrich noch auswertbar, gehäuft bis überwiegend Deformationen (< 50 % der Zellen deformiert)
- Ausstrich aufgrund starker Deformationen nicht auswertbar (> 50 % der Zellen deformiert)

Als Deformationen wurden abgelöste Fäden der Baumwolltupfer, Zellklumpen, nicht differenzierbare Zellanhäufungen sowie einzelne, stark deformierte Zellen, die nicht eindeutig einem speziellen Zelltyp zugeordnet werden konnten, interpretiert.

Anschließend wurden je Ausstrich sieben Gesichtsfelder bei 400facher Vergrößerung hinsichtlich folgender Parameter ausgezählt:

- Anzahl Endometriumszellen
- Anzahl neutrophiler Granulozyten

Um eine repräsentative Untersuchung zu gewährleisten, führte neben zu starken Deformationen auch eine ungenügende Menge an Zellmaterial im Ausstrich zu einem Ausschluß aus der Studie.

Eine Probe wurde als geringzellig und somit als nicht auswertbar eingestuft, wenn bei 400facher Vergrößerung weniger als 35 Zellen (Endometriumszellen, neutrophile Granulozyten) in sieben Gesichtsfeldern ausgezählt werden konnten.

Anhand der Gesamtendometriumszellanzahl und der Zahl neutrophiler Granulozyten erfolgte die Berechnung des Neutrophilen-Index nach Ricketts und Mackintosh (1987):

- | | | | |
|-------|-------|---|--------------------------|
| - - | 0 | % | neutrophile Granulozyten |
| - +/- | ≤ 0,5 | % | neutrophile Granulozyten |
| - + | 0,5-5 | % | neutrophile Granulozyten |
| - ++ | 5-30 | % | neutrophile Granulozyten |
| - +++ | ≥ 30 | % | neutrophile Granulozyten |

Material und Methode

Die Zahl der Erythrozyten pro Gesichtsfeld wurde in Anlehnung an Ehlers (2000) geschätzt. Es wurde folgende Einteilung vorgenommen:

- keine sichtbar
- vereinzelt
- zahlreich
- massenhaft

3.5 Statistische Methoden

Die Datensätze wurden unter Verwendung des Tabellenkalkulationsprogramms Microsoft® Office Excel 2007 (Microsoft Corporation) verwaltet. Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Dabei kamen die Statistikprogramm Pakete BMDP/Dynamic, Release 7.0 (Dixon, 1993) und BiAS (Ackermann, 1998) zur Anwendung. Der größte Teil der graphischen Darstellungen wurde mit Hilfe von Excel-Tabellen und den Diagramm-Funktionen dieses Programms (Microsoft® Office Excel 2007, Microsoft Corporation) erstellt.

Zur statistischen Beschreibung der Daten wurden arithmetische Mittelwerte (\bar{x}_a), Standardabweichungen (s), Median und Stichprobenumfänge (n) berechnet und tabellarisch wiedergegeben. Die Angabe des Mittelwertes und der Standardabweichung erfolgte in der Regel bis auf zwei Stellen hinter dem Komma.

Für die Gegenüberstellung der Merkmale Vergleich Anzahl positiver Zytologien zwischen den Entnahmesystemen, Vergleich Zytologie-Anamnese und Vergleich bakteriologisches Ergebnis mit zytologischem Ergebnis wurden Häufigkeitstabellen (Kontingenztafeln) mit dem Programm BMDP4F erzeugt und mit dem verallgemeinerten Fisher-Test/Chi-Quadrat-Test auf signifikante Zusammenhänge geprüft. Bei signifikanten Ergebnissen erfolgte zudem die Prüfung auf Symmetrie mit Hilfe des McNemar-Tests. Hierbei kam ein Eigenprogramm der AG Biomathematik und Datenverarbeitung zum Einsatz.

Beim Vergleich der zytologischen Parameter Anzahl auswertbarer Proben, Morphologie der Zellen und Nachweis von Erythrozyten wurde neben dem Chi-Quadrat-Test auch eine Konfigurationsfrequenzanalyse durchgeführt. Hierbei ist zu beachten, dass es sich um eine explorative Auswertung handelte, da die Daten nur teilweise aus gepaarten Stichproben stammten und somit nicht immer unabhängig waren.

Bei den Gruppenvergleichen der Merkmale Vergleich der durchschnittlichen Anzahl an Endometriuszellen und neutrophilen Granulozyten pro Gesichtsfeld zwischen den Systemen kam der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test unter Verwendung des Programms BMDP3S zum Einsatz.

Die Berechnung der Korrelation zwischen der durchschnittlichen Anzahl an Endometriuszellen pro Gesichtsfeld bei den einzelnen Systemen, sowie des Zusammenhanges zwischen Keimstärke und Neutrophilen-Index erfolgte mit dem Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman (r_s) durch das Programm BMDP3S. Für die durchschnittliche Anzahl an neutrophilen Granulozyten pro Gesichtsfeld konnte aufgrund der hohen Anzahl an Nullwerten keine Korrelation berechnet werden.

Die Einflüsse der einzelnen Merkmale auf die Trächtigkeitsrate wurden mittels einer schrittweisen multiplen logistischen Regression mit dem Programm BMDPLR überprüft. Dabei wurde der Einfluss des Nachweises fakultativ pathogener Keime folgendermaßen ausgewertet:

- Maximum pathogene Keime: hierbei sollte untersucht werden, ob die Höhe des Keimgehaltes einen Einfluss auf das Ergebnis hat, also ob Stuten mit geringem Keimgehalt bessere Trächtigkeitsergebnisse aufweisen als Stuten mit hohem Keimgehalt in der Gebärmutter. Von jeder Stute wurde nur der Keim mit dem höchsten Wert berücksichtigt.
- Summe pathogene Keime: beim Nachweis mehrerer Keime in einer Probe wurden die Werte summiert, um herauszufinden, ob die Addition der Keimstärken einen Einfluss auf die Trächtigkeitsrate ausübt.

4 Ergebnisse

4.1 Angaben zum Stutenkollektiv und der gynäkologischen Untersuchung

Es wurden 340 Stuten, von denen zytologische sowie in 279 Fällen zusätzlich auch bakteriologische intrauterine Proben entnommen wurden, in die Studie aufgenommen. Davon führten 43 Stuten (13 %) ein Fohlen bei Fuß, bei 83 Stuten (24 %) handelte es sich um Maidenstuten. Die güsten Stuten stellten mit 124 Tieren (37 %) die zahlenmäßig größte Gruppe dar. Weitere 42 Stuten (12 %) mit Trächtigkeitsproblemen sowie 48 Stuten (14 %), die bereits erfolgreich im Zuchteinsatz waren, jedoch ein oder mehrere Jahre nicht besamt wurden, ergänzten das Kollektiv (Tabelle 9).

Tabelle 9: Anamnestische Angaben zu den untersuchten Stuten (n = 340)

	Fohlenführende Stuten	Maiden-Stuten	Güste Stuten	Stuten mit Trächtigkeitsproblemen	Ein- oder mehrjährig nicht besamte Stuten
Anzahl Stuten	43	83	124	42	48

Von den 340 Stuten wiesen 24 Stuten (7 %) uterine Zysten auf. Intrauterine Flüssigkeitsansammlungen konnten bei 42 Stuten (12 %) festgestellt werden, wobei der Durchmesser des flüssigkeitsgefüllten *Cavum uteri* im ultrasonographischen Bild bei 20 Stuten (6 %) weniger als 2 cm betrug und bei 22 Stuten (7 %) ein Durchmesser von über 2 cm gemessen wurde. Bei 285 Stuten (84 %) waren weder Zysten noch Flüssigkeit nachweisbar, während bei 55 Stuten (16 %) mindestens einer dieser Befunde vorlag.

4.2 Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung der Uterustupferproben

Bei 73 (26 %) der 279 Proben zeigte sich kein Keimwachstum. In den übrigen 206 Proben (74 %) konnten Bakterien nachgewiesen werden, die sich auf 18 verschiedene Spezies verteilten (Tabelle 10, Abbildung 5). Bei den nachgewiesenen Keimarten handelte es sich um β -hämolsierende Streptokokken, *Escherichia coli*, *Escherichia coli variatio hämolytica*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Staphylococcus aureus*, Hefen, α -hämolsierende Streptokokken, γ -hämolsierende Streptokokken, *Staphylococcus epidermidis*, *Acinetobacter*, aerobe Bazillen, coliforme Keime, *Corynebacterium spp.*, Enterokokken, *Citrobacter spp.*, Mikrokokken, *Alcaligenes* und unspezifisches Keimwachstum.

Tabelle 10: Häufigkeit der nachgewiesenen Keimarten in den Uterustupferproben (n = 279), angegeben ist die Anzahl positiver Nachweise sowie deren prozentualer Anteil bezogen auf die Gesamtzahl der Tupfer

Bakterienspezies	Anzahl positiver Nachweise	Relative Häufigkeit (%)
<i>Escherichia coli</i>	93	33
β -hämolsierende Streptokokken	72	26
α -hämolsierende Streptokokken	48	17
γ -hämolsierende Streptokokken	33	12
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	32	11
<i>Acinetobacter</i>	26	9
coliforme Keime	21	8
unspezifisches Keimwachstum	21	8
aerobe Bazillen	14	5
<i>Klebsiella spp.</i>	14	5
<i>Pseudomonas spp.</i>	14	5
<i>Corynebacterium spp.</i>	12	4
Enterokokken	7	3
<i>Citrobacter spp.</i>	5	2

Ergebnisse

Bakterienspezies	Anzahl positiver Nachweise	Relative Häufigkeit
Escherichia coli-hämolyzierend	2	0,7
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	0,7
Mikrokokken	1	0,4
Alcaligenes	1	0,4
Hefen	1	0,4

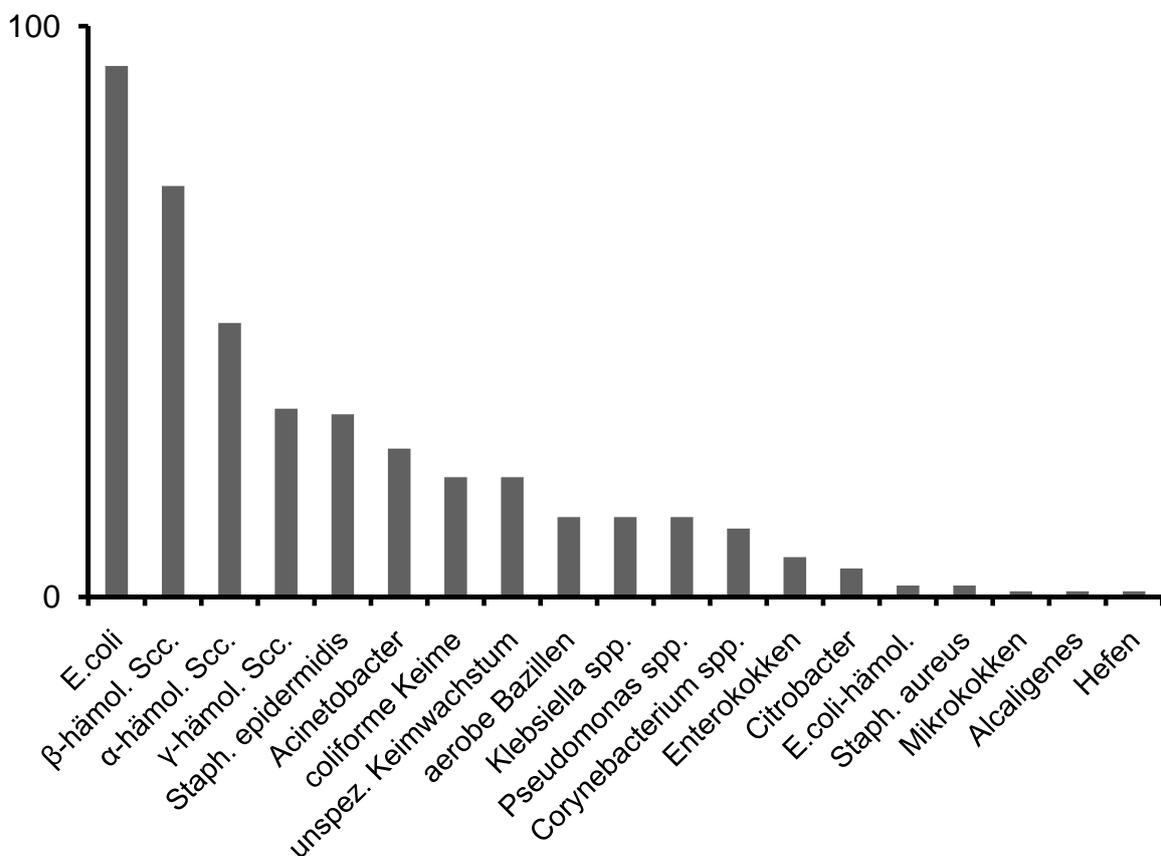


Abbildung 5: Absolute Häufigkeit der nachgewiesenen Keimarten in positiven Uterustupferproben (n = 279) [E. = Escherichia, hämol. = hämolysierend, Scc. = Streptokokken, Staph. = Staphylococcus, unspesz. = unspezifisches, spp. = Subspezies]

Escherichia coli war der am häufigsten nachgewiesene Keim. Häufig lag eine Mischbesiedlung mit anderen Bakterienarten vor. Der Nachweis in Reinkultur gelang deutlich seltener (Tabelle 11, Abbildung 6).

Tabelle 11: Anzahl positiver Nachweise von *Escherichia coli* (E.coli) [n = 93] in Reinkultur oder Mischkultur mit Angabe der Stärke des Keimgehaltes

	E.coli / Reinkultur	E.coli / Mischkultur pathogen	E.coli / Mischkultur apathogen
Einzelkolonien	0	0	0
geringer Keimgehalt	2	6	7
mittlerer Keimgehalt	3	7	0
hoher Keimgehalt	14	33	21
Gesamtanzahl	19 (20 %)	46 (50 %)	28 (30 %)

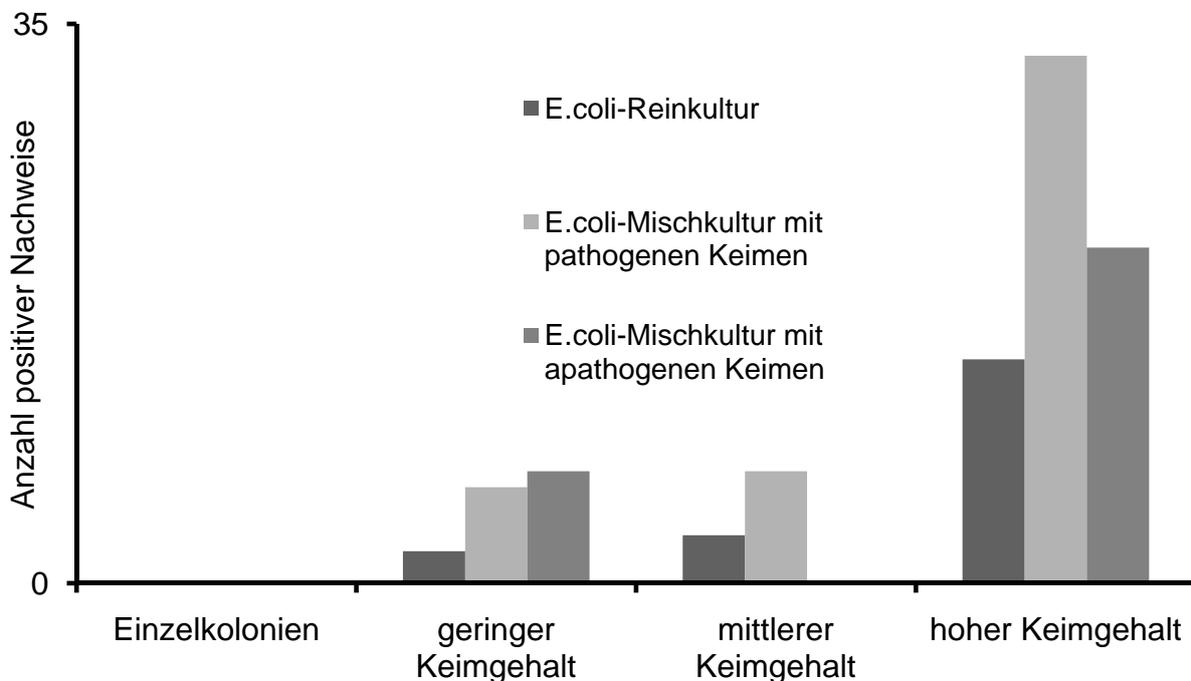


Abbildung 6: Anzahl positiver Nachweise von *Escherichia coli* (n = 93) in Reinkultur oder Mischkultur

Ergebnisse

In 72 Proben (26 %) konnte ein Wachstum von β -hämolyzierenden Streptokokken festgestellt werden, überwiegend in Mischkultur mit anderen pathogenen Keimen. Ein Wachstum in Reinkultur oder in Mischkultur mit apathogenen Keimen war weitaus seltener zu sehen (Tabelle 12, Abbildung 7).

Tabelle 12: Anzahl positiver Nachweise von β -hämolyzierenden Streptokokken (β -häm. Scc.) [n = 72] in Reinkultur oder Mischkultur mit Angabe der Stärke des Keimgehaltes

	β -häm. Scc. / Reinkultur	β -häm. Scc. / Mischkultur pathogen	β -häm. Scc. / Mischkultur apathogen
Einzelkolonien	0	0	0
geringer Keimgehalt	10	31	11
mittlerer Keimgehalt	2	8	0
hoher Keimgehalt	2	4	4
Gesamtanzahl	14 (19 %)	43 (60 %)	15 (21 %)

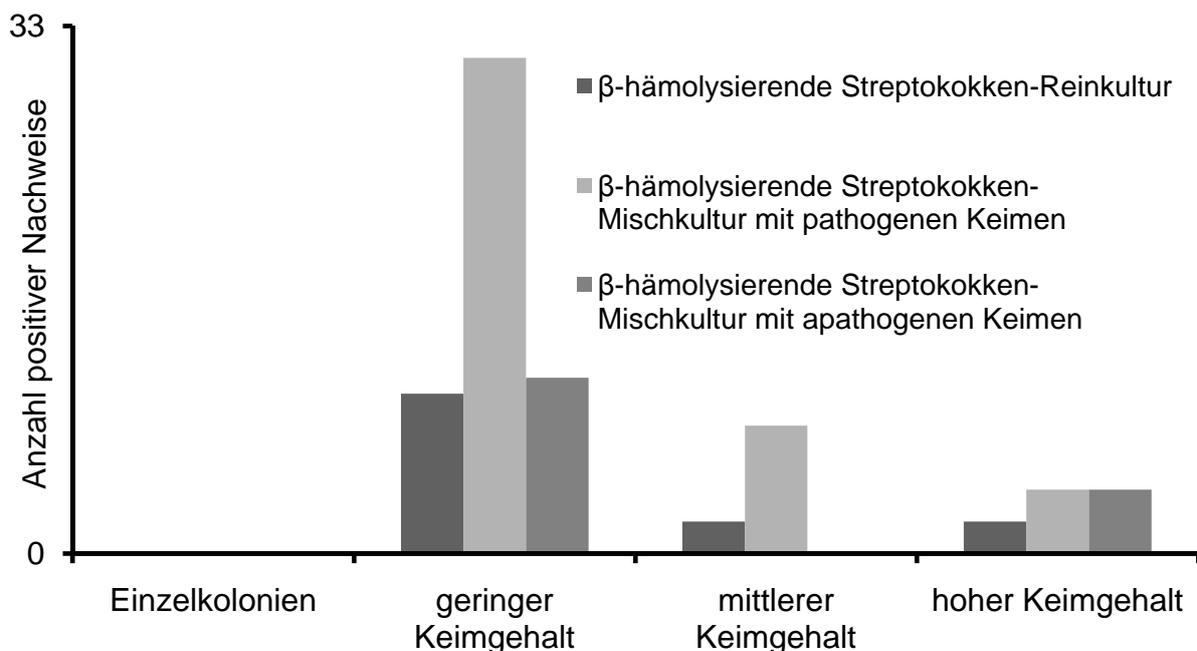


Abbildung 7: Anzahl positiver Nachweise von β -hämolyzierenden Streptokokken (n = 72) in Reinkultur oder Mischkultur

In 48 Proben (17 %) konnten α -hämolyisierende Streptokokken isoliert werden. Bei gut zwei Drittel gelang der positive Nachweis zusammen mit pathogenen Keimen, das Wachstum in Reinkultur oder Mischkultur mit apathogenen Keimen war weitaus seltener (Tabelle 13, Abbildung 8).

Tabelle 13: Anzahl positiver Nachweise von α -hämolyisierenden Streptokokken (α -häm. Scc.) [n = 48] in Reinkultur oder Mischkultur mit Angabe der Stärke des Keimgehaltes

	α -häm. Scc. / Reinkultur	α -häm. Scc. / Mischkultur pathogen	α -häm. Scc. / Mischkultur apathogen
Einzelkolonien	0	1	0
geringer Keimgehalt	4	27	8
mittlerer Keimgehalt	0	6	0
hoher Keimgehalt	0	2	0
Gesamtanzahl	4 (8 %)	36 (75 %)	8 (17 %)

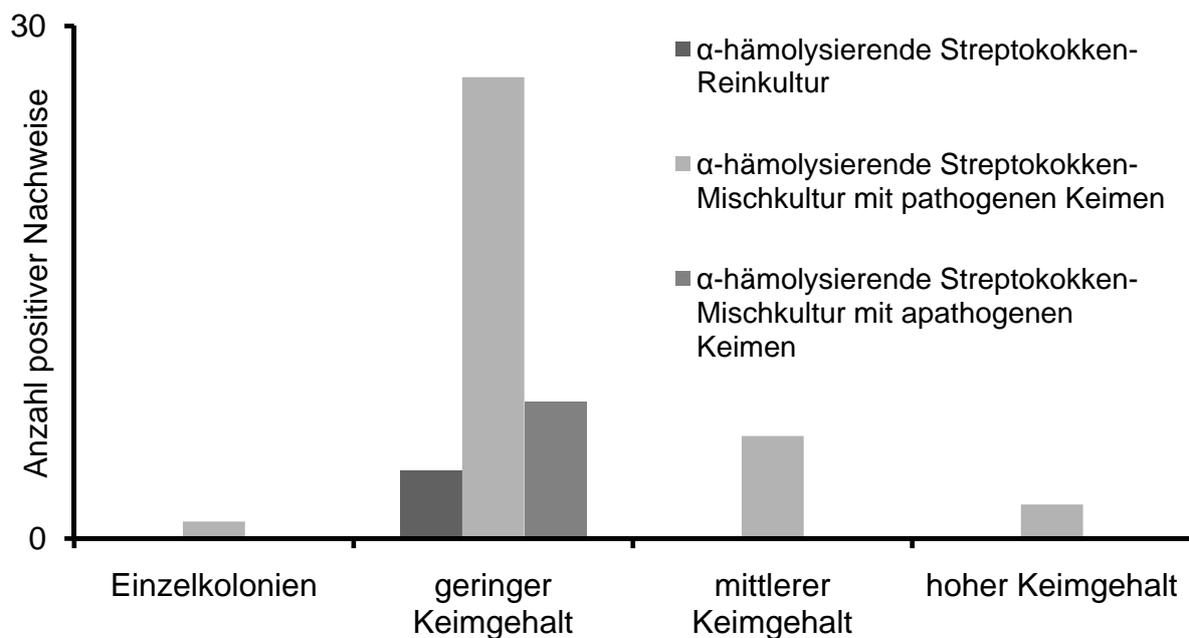


Abbildung 8: Anzahl positiver Nachweise von α -hämolyisierenden Streptokokken (n = 48) in Reinkultur oder Mischkultur

Ergebnisse

In 33 Proben (12%) wurden γ -hämolsierende Streptokokken gefunden (Tabelle 14, Abbildung 9).

Tabelle 14: Anzahl positiver Nachweise von γ -hämolsierenden Streptokokken (γ -häm. Scc.) [n = 33] in Reinkultur oder Mischkultur mit Angabe der Stärke des Keimgehaltes

	γ -häm. Scc. / Reinkultur	γ -häm. Scc. / Mischkultur pathogen	γ -häm. Scc. / Mischkultur apathogen
Einzelkolonien	0	0	0
geringer Keimgehalt	3	14	5
mittlerer Keimgehalt	0	5	1
hoher Keimgehalt	1	2	2
Gesamtanzahl	4 (12 %)	21 (64 %)	8 (24 %)

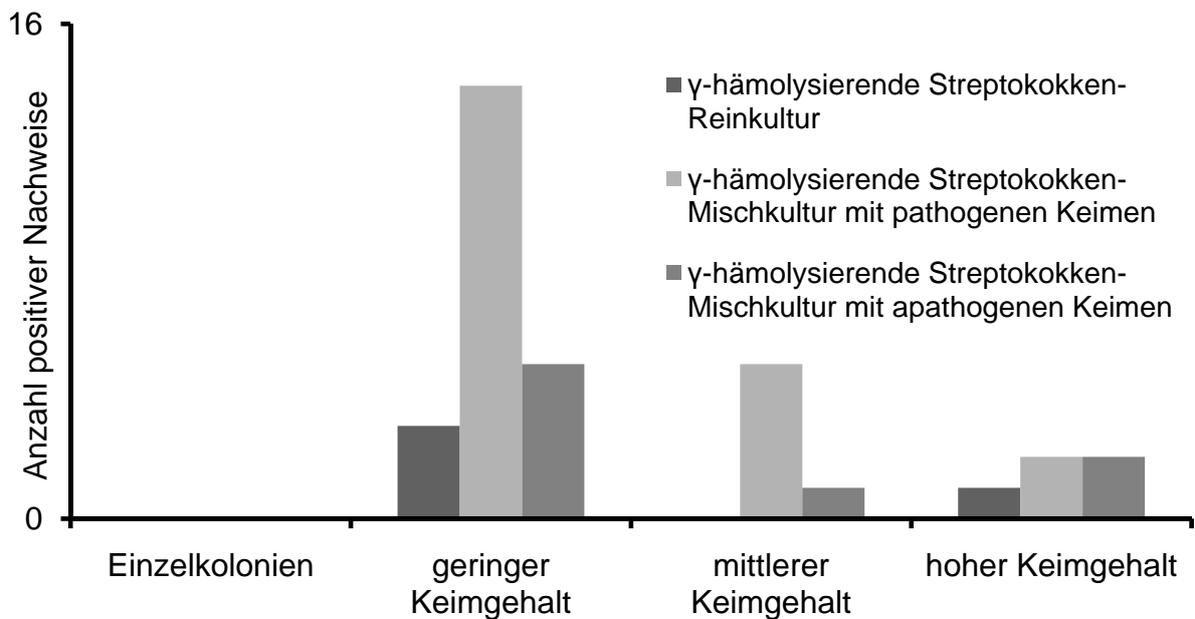


Abbildung 9: Anzahl positiver Nachweise von γ -hämolsierenden Streptokokken (n = 33) in Reinkultur oder Mischkultur

Staphylococcus epidermidis fand sich in 32 Proben (11%). Auch hier wurden in der Hälfte der Fälle zusätzlich pathogene Keime nachgewiesen (Tabelle 15, Abbildung 10).

Tabelle 15: Anzahl positiver Nachweise von *Staphylococcus epidermidis* (Staph. epiderm.) [n = 32] in Reinkultur oder Mischkultur mit Angabe der Stärke des Keimgehaltes

	Staph. epiderm. / Reinkultur	Staph. epiderm. / Mischkultur pathogen	Staph. epiderm. / Mischkultur apathogen
Einzelkolonien	1	1	0
geringer Keimgehalt	4	8	6
mittlerer Keimgehalt	0	3	0
hoher Keimgehalt	3	4	2
Gesamtanzahl	8 (25 %)	16 (50 %)	8 (25 %)

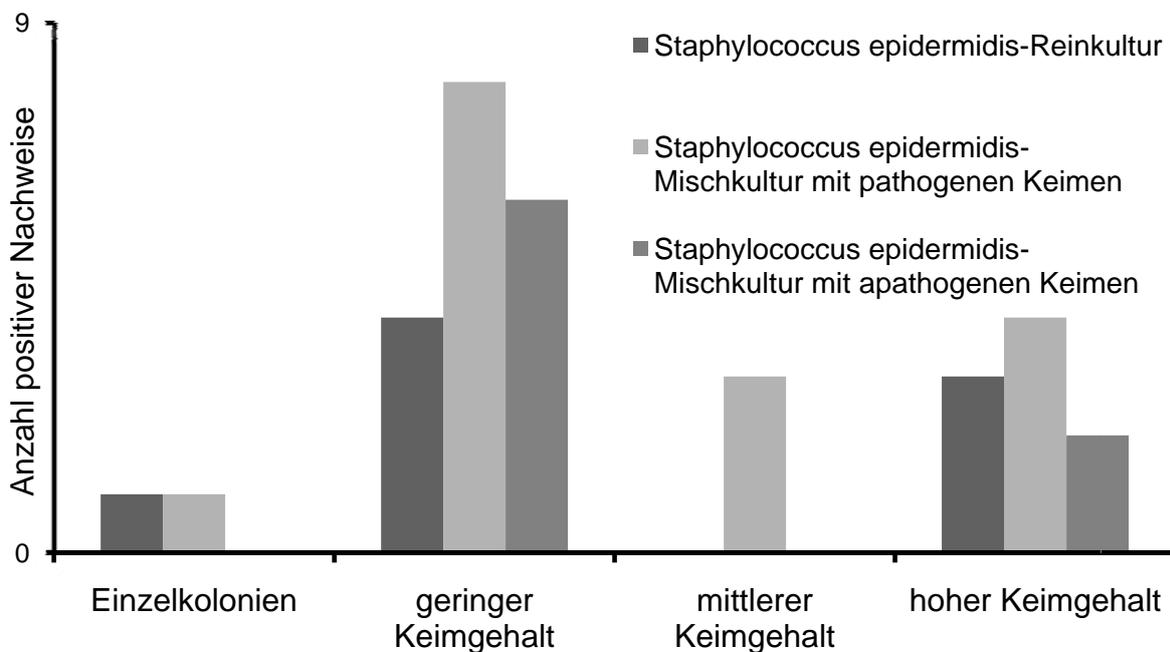


Abbildung 9: Anzahl positiver Nachweise von *Staphylococcus epidermidis* (n = 32) in Reinkultur oder Mischkultur

Ergebnisse

Ein Acinetobacter-Nachweis gelang in 9 % der Proben, allerdings fast nur in Mischkultur mit anderen Keimen. Ein Wachstum in Reinkultur konnte nur einmal beobachtet werden (Tabelle 16, Abbildung 11).

Tabelle 16: Anzahl positiver Nachweise von Acinetobacter (n = 26) in Reinkultur oder Mischkultur mit Angabe der Stärke des Keimgehaltes

	Acinetobacter / Reinkultur	Acinetobacter / Mischkultur pathogen	Acinetobacter / Mischkultur apathogen
Einzelkolonien	0	0	0
geringer Keimgehalt	1	10	4
mittlerer Keimgehalt	0	4	1
hoher Keimgehalt	0	3	3
Gesamtanzahl	1 (4 %)	17 (65 %)	8 (31 %)

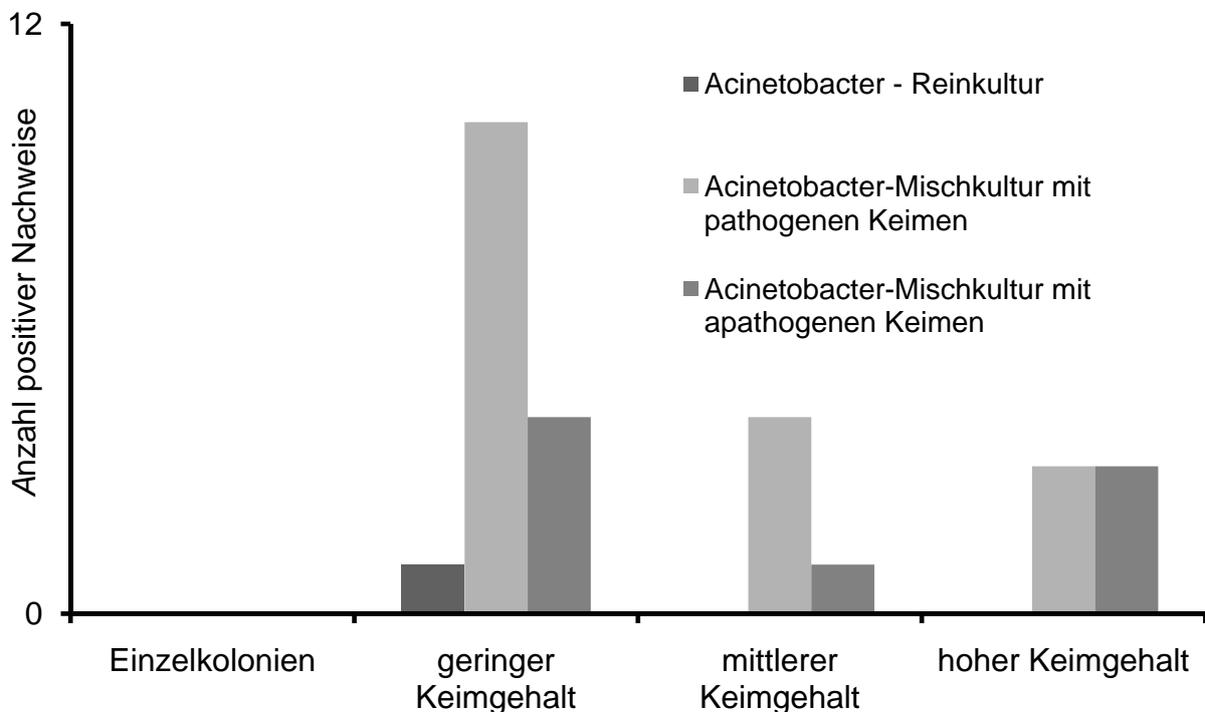


Abbildung 11: Anzahl positiver Nachweise von Acinetobacter (n = 32) in Reinkultur oder Mischkultur

Coliforme Keime konnten in 21 Proben (8 %) gefunden werden (Tabelle 17, Abbildung 12).

Tabelle 17: Anzahl positiver Nachweise von coliformen Keimen (n = 21) in Reinkultur oder Mischkultur mit Angabe der Stärke des Keimgehaltes

	Coliforme Keime / Reinkultur	Coliforme Keime / Mischkultur pathogen	Coliforme Keime / Mischkultur apathogen
Einzelkolonien	0	0	0
geringer Keimgehalt	2	11	1
mittlerer Keimgehalt	0	3	1
hoher Keimgehalt	0	3	0
Gesamtanzahl	2 (10 %)	17 (80 %)	2 (10 %)

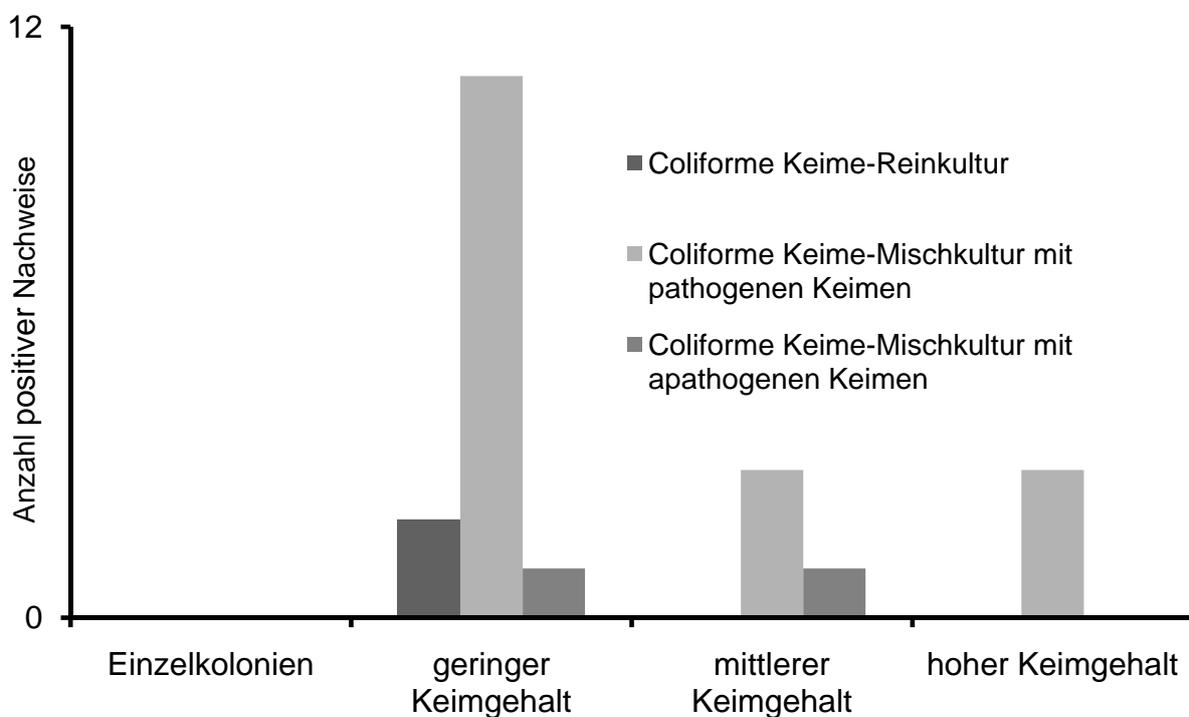


Abbildung 12: Anzahl positiver Nachweise von coliformen Keimen (n = 21) in Reinkultur oder Mischkultur

Ergebnisse

In 21 Proben (8 %) wurde ein unspezifisches Keimwachstum nachgewiesen (Tabelle 18, Abbildung 13).

Tabelle 18: Anzahl positiver Nachweise von unspezifischem Keimwachstum (Unsp. Keimw.) [n = 21] in Reinkultur oder Mischkultur mit Angabe der Stärke des Keimgehaltes

	Unspez. Keimw. / Reinkultur	Unspez. Keimw. / Mischkultur pathogen	Unspez. Keimw. / Mischkultur apathogen
Einzelkolonien	4	0	0
geringer Keimgehalt	1	0	0
mittlerer Keimgehalt	8	4	0
hoher Keimgehalt	4	0	0
Gesamtanzahl	17 (81 %)	4 (19 %)	0 (0 %)

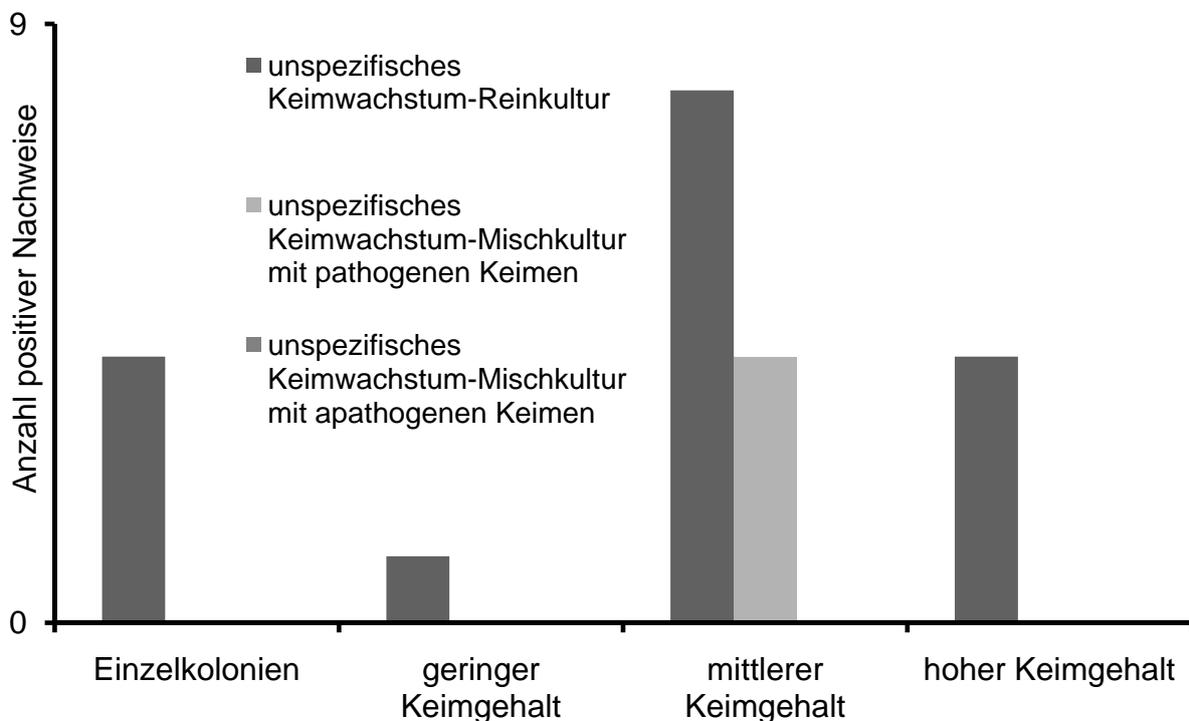


Abbildung 13: Anzahl positiver Nachweise von unspezifischem Keimwachstum (n = 21) in Reinkultur oder Mischkultur

Der Nachweis von aeroben Bazillen war in 14 Proben (5 %) positiv. Sie traten häufiger in Reinkultur oder zusammen mit pathogenen als mit apathogenen Keimen auf (Tabelle 19, Abbildung 14).

Tabelle 19: Anzahl positiver Nachweise von aeroben Bazillen (n = 14) in Reinkultur oder Mischkultur mit Angabe der Stärke des Keimgehaltes

	Aerobe Bazillen / Reinkultur	Aerobe Bazillen / Mischkultur pathogen	Aerobe Bazillen / Mischkultur apathogen
Einzelkolonien	0	0	0
geringer Keimgehalt	6	4	2
mittlerer Keimgehalt	0	1	0
hoher Keimgehalt	0	0	1
Gesamtzahl	6 (43 %)	5 (36 %)	3 (21 %)

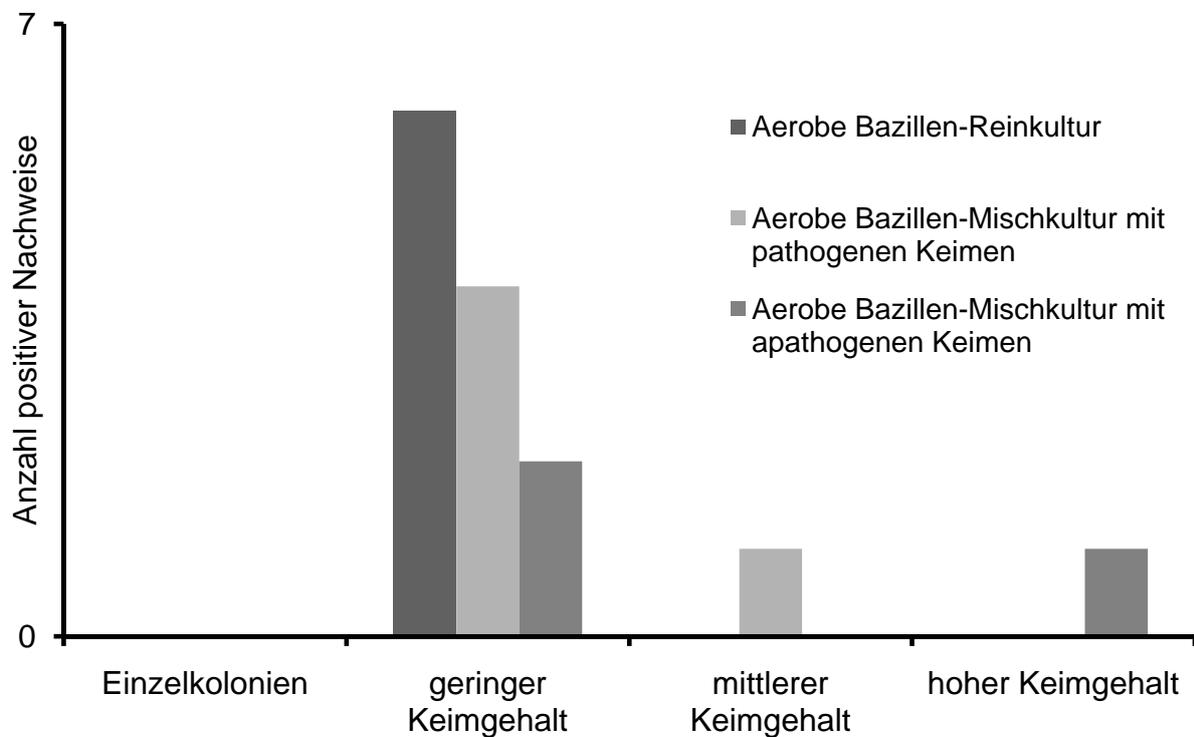


Abbildung 14: Anzahl positiver Nachweise von aeroben Bazillen (n = 14) in Reinkultur oder Mischkultur

Ergebnisse

In 14 Proben (5 %) wurden *Klebsiella spp.* gefunden, in den meisten Fällen zusammen mit anderen pathogenen Keimen (Tabelle 20, Abbildung 15).

Tabelle 20: Anzahl positiver Nachweise von *Klebsiella spp.* (n = 14) in Reinkultur oder Mischkultur mit Angabe der Stärke des Keimgehaltes

	Klebsiella spp. / Reinkultur	Klebsiella spp. / Mischkultur pathogen	Klebsiella spp. / Mischkultur apathogen
Einzelkolonien	0	0	0
geringer Keimgehalt	1	3	0
mittlerer Keimgehalt	0	2	0
hoher Keimgehalt	2	4	2
Gesamtanzahl	3 (21 %)	9 (64 %)	2 (14 %)

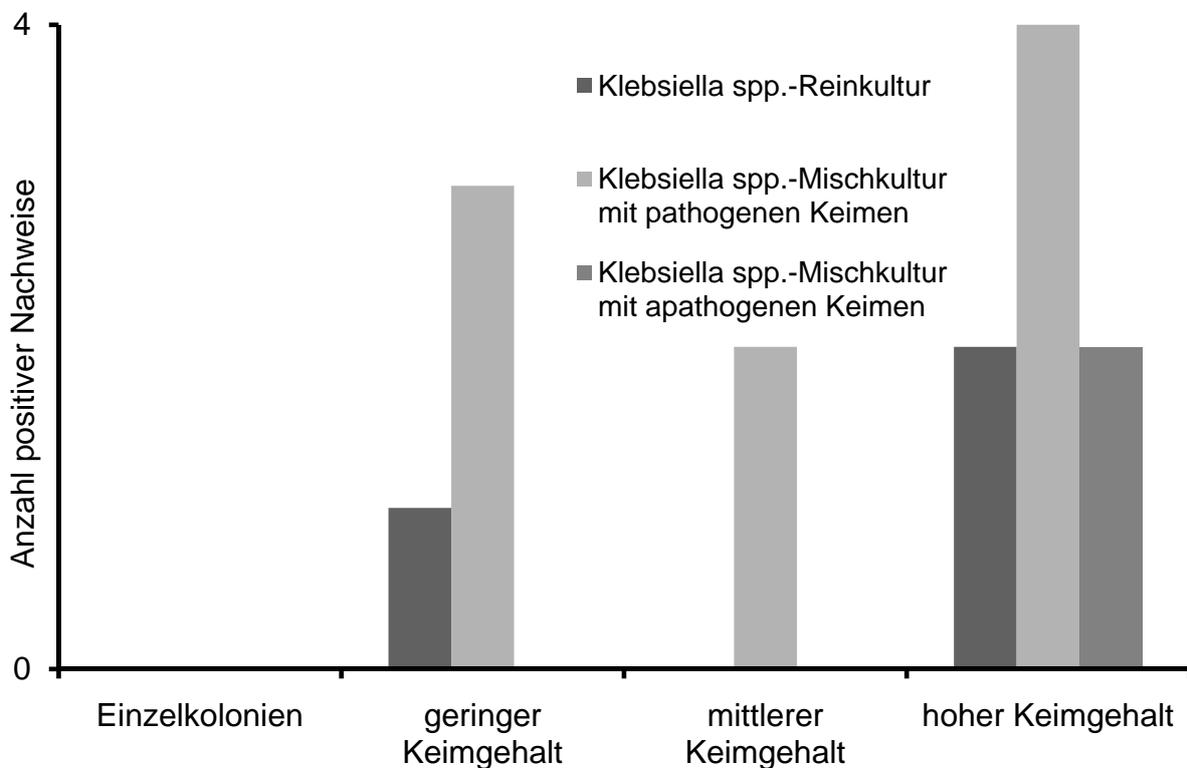


Abbildung 15: Anzahl positiver Nachweise von *Klebsiella spp.* (n = 14) in Reinkultur oder Mischkultur

Ebenfalls in 14 Proben (5%) konnten *Pseudomonas spp.* isoliert werden, davon allerdings nur einmal in Reinkultur (Tabelle 21 und Abbildung 16).

Tabelle 21: Anzahl positiver Nachweise von *Pseudomonas spp.* (*Pseudomon. spp.*) [n = 14] in Reinkultur oder Mischkultur mit Angabe der Stärke des Keimgehaltes

	Pseudomon. spp. / Reinkultur	Pseudomon. spp. / Mischkultur pathogen	Pseudomon. spp. / Mischkultur apathogen
Einzelkolonien	0	0	0
geringer Keimgehalt	1	4	3
mittlerer Keimgehalt	0	2	0
hoher Keimgehalt	0	3	1
Gesamtanzahl	1 (7 %)	9 (64 %)	4 (29 %)

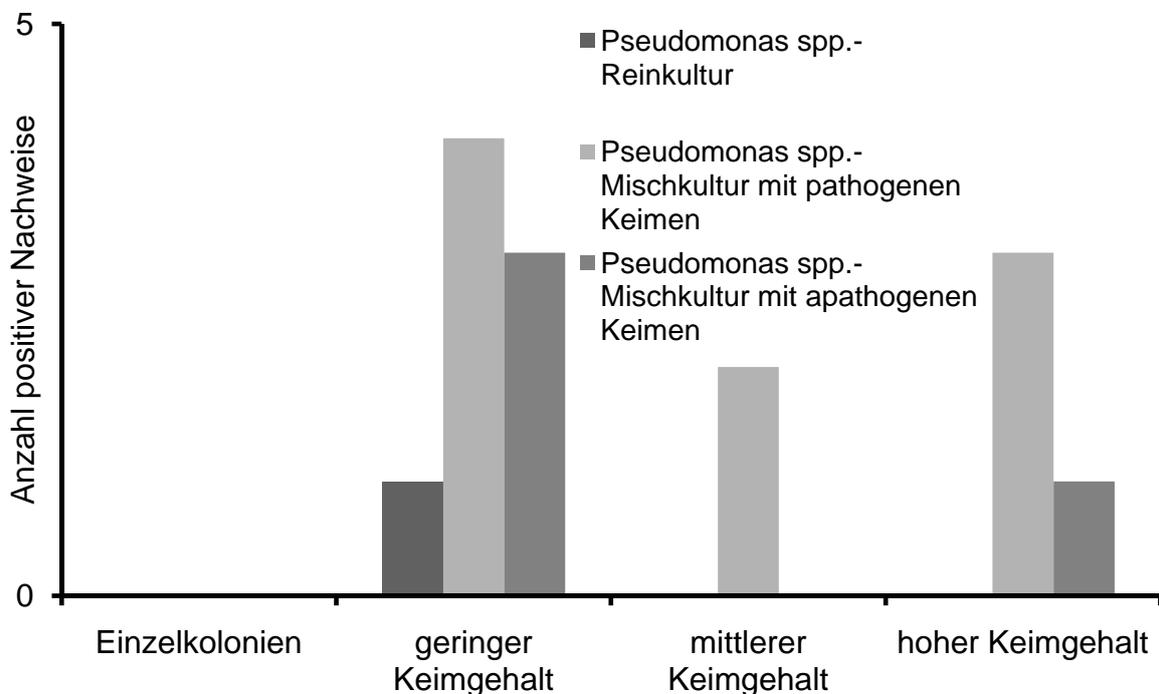


Abbildung 16: Anzahl positiver Nachweise von *Pseudomonas spp.* (n = 14) in Reinkultur oder Mischkultur

Ergebnisse

In 12 Proben (4 %) zeigte sich ein Wachstum von *Corynebacterium spp.* (Tabelle 22, Abbildung 17).

Tabelle 22: Anzahl positiver Nachweise von *Corynebacterium spp.* (*Corynebact. spp.*) [n = 12] in Reinkultur oder Mischkultur mit Angabe der Stärke des Keimgehaltes

	Corynebact. spp. / Reinkultur	Corynebact. spp. / Mischkultur pathogen	Corynebact.spp. / Mischkultur apathogen
Einzelkolonien	0	1	0
geringer Keimgehalt	2	3	4
mittlerer Keimgehalt	0	1	0
hoher Keimgehalt	0	1	0
Gesamtanzahl	2 (17 %)	6 (50 %)	4 (33 %)

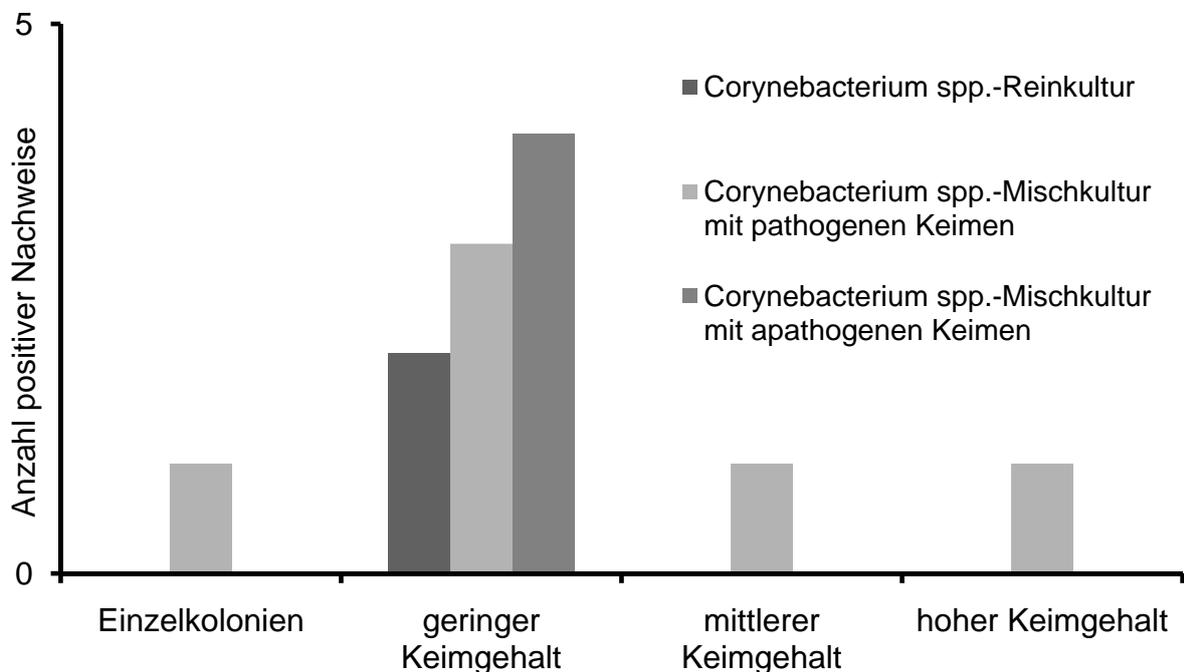


Abbildung 17: Anzahl positiver Nachweise von *Corynebacterium spp.* (n = 12) in Reinkultur oder Mischkultur

Enterokokken wurden in sieben Proben (3 %) nachgewiesen (Tabelle 23, Abbildung 18).

Tabelle 23: Anzahl positiver Nachweise von Enterokokken (n = 7) in Reinkultur oder Mischkultur mit Angabe der Stärke des Keimgehaltes

	Enterokokken / Reinkultur	Enterokokken / Mischkultur pathogen	Enterokokken / Mischkultur apathogen
Einzelkolonien	0	0	0
geringer Keimgehalt	1	1	0
mittlerer Keimgehalt	1	0	0
hoher Keimgehalt	1	1	2
Gesamtanzahl	3 (42%)	2 (29 %)	2 (29 %)

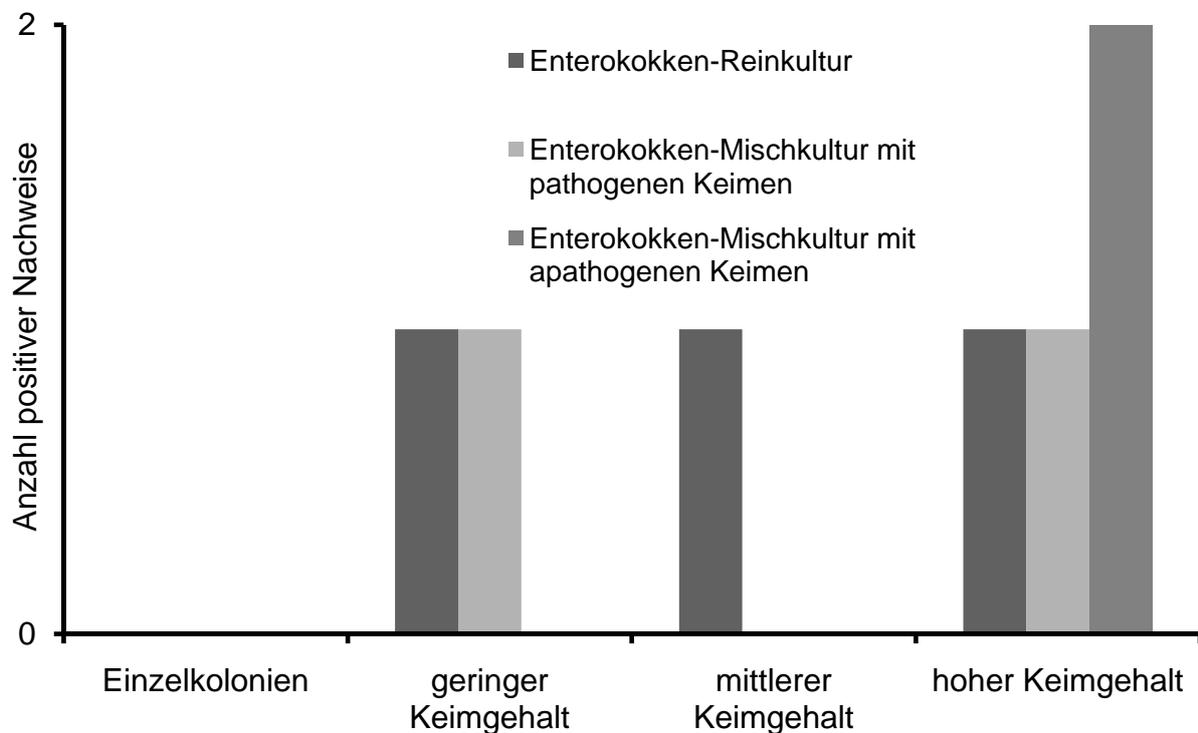


Abbildung 18: Anzahl positiver Nachweise von Enterokokken (n = 7) in Reinkultur oder Mischkultur

Ergebnisse

Der Nachweis von *Citrobacter spp.* war in fünf Proben (2 %) positiv. Es fiel auf, dass in allen fünf positiven Proben ein hoher Keimgehalt festgestellt wurde (Tabelle 24, Abbildung 19).

Tabelle 24: Anzahl positiver Nachweise von *Citrobacter spp.* (n = 5) in Reinkultur oder Mischkultur mit Angabe der Stärke des Keimgehaltes

	Citrobacter spp. / in Reinkultur	Citrobacter spp./ Mischkultur pathogen	Citrobacter spp./ Mischkultur apathogen
Einzelkolonien	0	0	0
geringer Keimgehalt	0	0	0
mittlerer Keimgehalt	0	0	0
hoher Keimgehalt	0	3	2
Gesamtanzahl	0 (0 %)	3 (60 %)	2 (40 %)

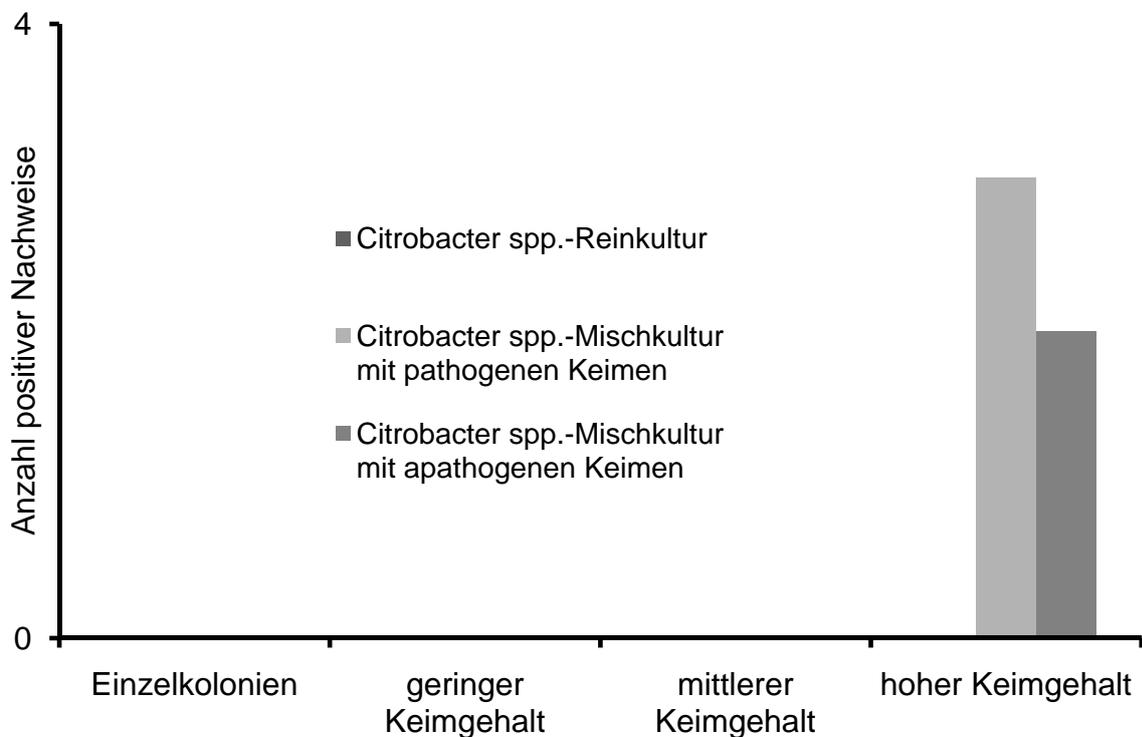


Abbildung 19: Anzahl positiver Nachweise von *Citrobacter spp.* (n = 5) in Reinkultur oder Mischkultur

In zwei Proben (0,7 %) konnte ein Wachstum von *Escherichia coli variatio haemolytica* festgestellt werden (Tabelle 25, Abbildung 20).

Tabelle 25: Anzahl positiver Nachweise von *Escherichia coli variatio haemolytica* (*E.coli-häm.*) [n = 2] in Reinkultur oder Mischkultur mit Angabe der Stärke des Keimgehaltes

	E.coli-häm. / Reinkultur	E.coli-häm. / Mischkultur pathogen	E.coli häm. / Mischkultur apathogen
Einzelkolonien	0	0	0
geringer Keimgehalt	0	1	1
mittlerer Keimgehalt	0	0	0
hoher Keimgehalt	0	0	0
Gesamtanzahl	0 (0 %)	1 (50 %)	1 (50 %)

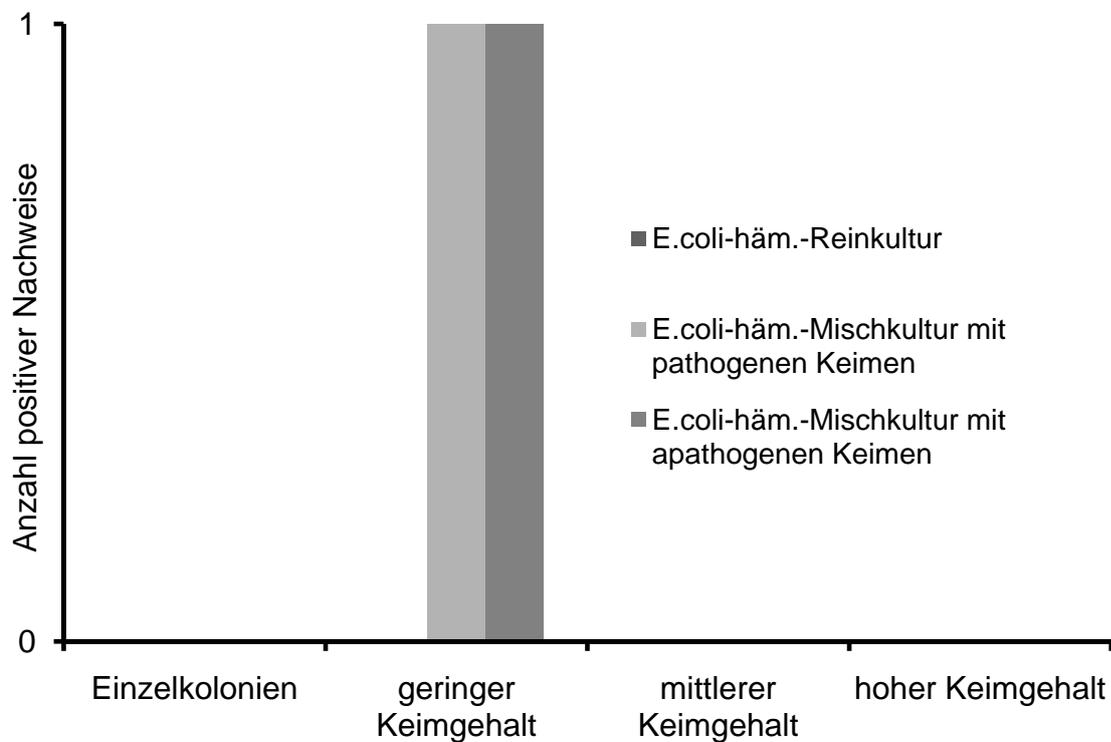


Abbildung 20: Anzahl positiver Nachweise von *Escherichia coli variatio haemolytica* (*E.coli-häm*) [n = 2] in Reinkultur oder Mischkultur

Ergebnisse

Staphylococcus aureus konnte ebenfalls nur in zwei Proben (0,7 %) nachgewiesen werden (Tabelle 26, Abbildung 21).

Tabelle 26: Anzahl positiver Nachweise von *Staphylococcus aureus* (*Staph. aureus*) [n = 2] in Reinkultur oder Mischkultur mit Angabe der Stärke des Keimgehaltes

	Staph. aureus / Reinkultur	Staph. aureus / Mischkultur pathogen	Staph. aureus / Mischkultur apathogen
Einzelkolonien	0	0	0
geringer Keimgehalt	0	0	2
mittlerer Keimgehalt	0	0	0
hoher Keimgehalt	0	0	0
Gesamtanzahl	0 (0 %)	0 (0 %)	2 (100 %)

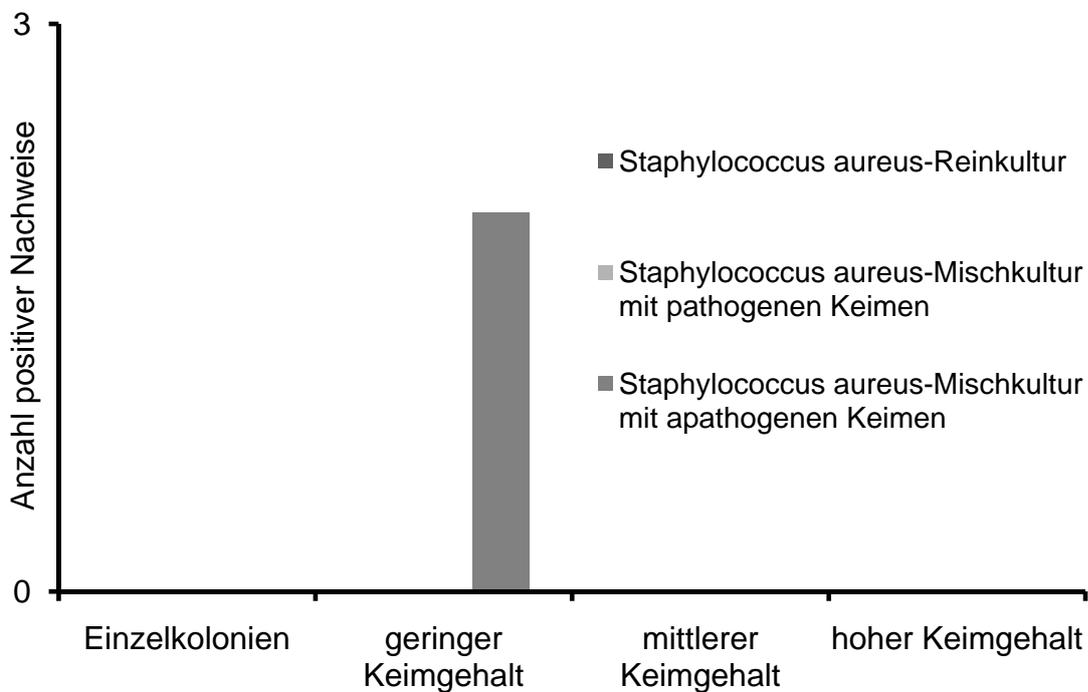


Abbildung 21: Anzahl positiver Nachweise von *Staphylococcus aureus* (n = 2) in Reinkultur oder Mischkultur

Der Nachweis von Mikrokokken (geringer Keimgehalt, Mischkultur mit pathogenen Keimen), Alcaligenes (hoher Keimgehalt, Reinkultur) und Hefen war jeweils nur in einer Probe (0,4%) positiv.

4.3 Ergebnisse der exfoliativen Endometriumszytologien

4.3.1 Zelldifferenzierung

Aufgrund der für den jeweiligen Zelltyp charakteristischen morphologischen Besonderheiten ließen sich die Endometriumszellen gut von den neutrophilen Granulozyten differenzieren. Die überwiegend basal liegenden, lila angefärbten Kerne der Endometriumszellen waren meist von einem deutlichen, bläulich gefärbten Zytoplasmasaum umgeben, der allerdings in einigen Fällen auch nur schwach angefärbt war. Vereinzelt tauchten Endometriumszellen mit einem Zilienbesatz auf (Abbildung 22).

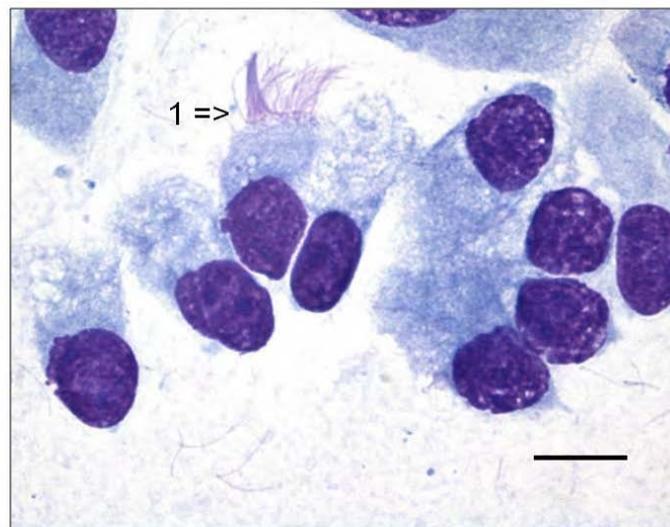


Abbildung 22: Endometriumszytologie von einer Stute im Östrus. In der Bildmitte erkennt man eine Endometriumszelle mit Zilienbesatz (1), Entnahme mit CytologyBrush[®], Eosin-Thiazin-Färbung, Balkenlänge 10 µm

Ergebnisse

Die Form der Zellen schwankte zwischen rund, säulenförmig und kubisch. Gruppen- oder Nesterbildung konnte insbesondere bei der Entnahme mittels Knudsen-Katheter beobachtet werden (Abbildung 23), während die Zellen in mit dem CytologyBrush® entnommenen Proben eher vereinzelt lagen.

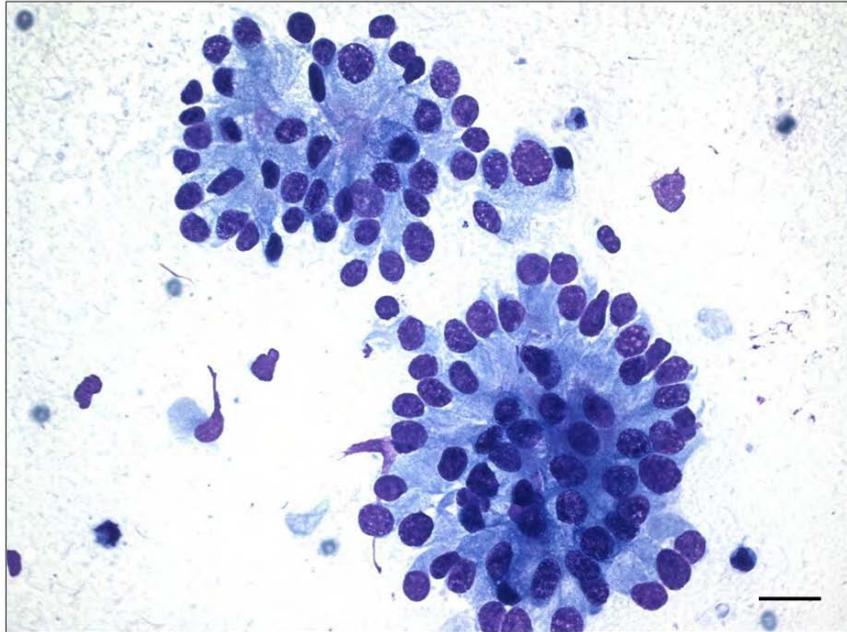


Abbildung 23: Endometriumszytologie von einer Stute im Diöstrus. Nesterbildung der Endometriumszellen, Entnahme mit Knudsen-Katheter, Eosin-Thiazin-Färbung, Balkenlänge 20 µm

Deformationen an den Zellen traten gehäuft bei der Entnahme mit dem Uteruskulturtupfer auf, wo die Zellen zum Teil so eng zusammengeballt waren, dass die Endometriumszellen nicht mehr einzeln angesprochen werden konnten (Abbildung 24). Dies führte dazu, dass eine Reihe von Proben nicht ausgewertet werden konnte.

Desweiteren wurde die Anzahl an neutrophilen Granulozyten ausgezählt. Während die Zellkerne gut darstellbar waren, färbte sich die Zellmembran häufig nur schwach an (Abbildung 25). Überwiegend handelte es sich um Granulozyten mit segmentiertem Kern, stabkernige neutrophile Granulozyten konnten nur selten nachgewiesen werden.

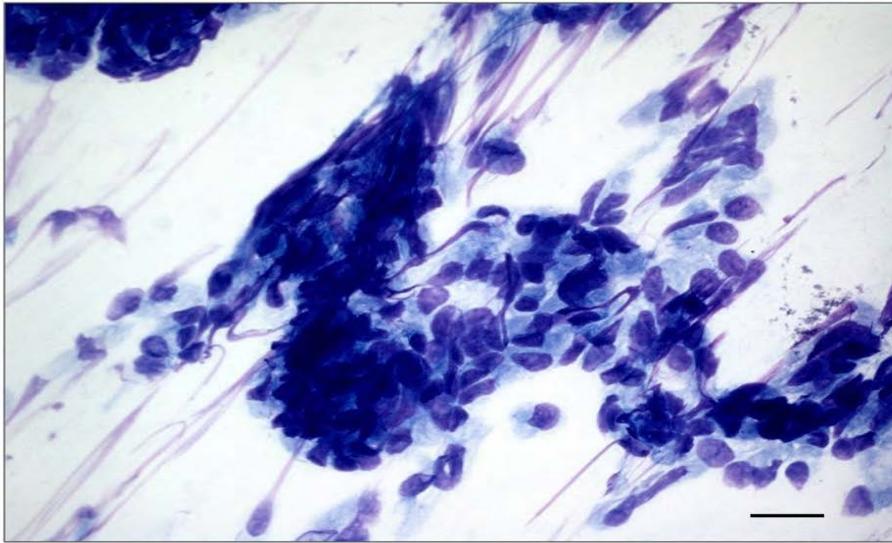


Abbildung 24: Endometriumszytologie von einer Stute im Östrus. Deformierte Endometriumszellen und Wattefäden, Entnahme mit Uteruskulturtupfer, Eosin-Thiazin-Färbung, Balkenlänge 20 µm

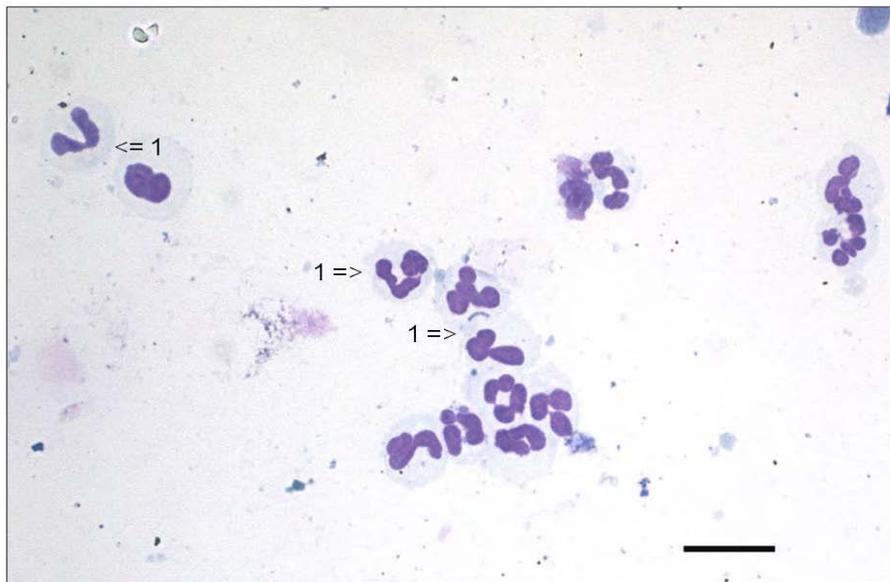


Abbildung 25: Endometriumszytologie von einer Stute im Östrus. Auf dem Bild sind ausschließlich segmentkernige neutrophile Granulozyten zu erkennen (1), Entnahme mit Knudsen-Katheter, Eosin-Thiazin-Färbung, Balkenlänge 20 µm

Ergebnisse

Die Erythrozyten waren deutlich kleiner als die Endometriumszellen und neutrophilen Granulozyten und von runder, zuweilen auch der typischen stechapfelförmigen Gestalt. Ein Kern lies sich nicht darstellen (Abbildung 26). In der verwendeten Färbung stellten sie sich grau dar und wiesen häufig eine zentral gelegene Aufhellung auf.

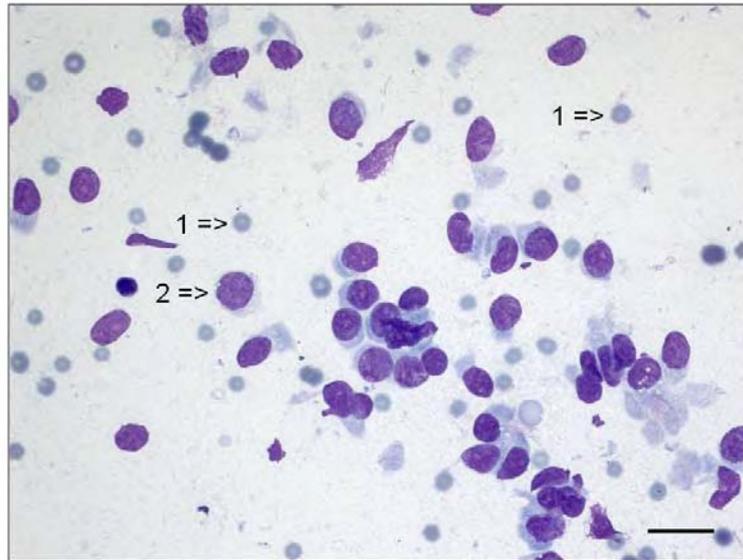


Abbildung 26: Endometriumszytologie von einer Stute im Östrus. Dargestellt sind Erythrozyten (1) und Endometriumszellen (2), Entnahme mit CytologyBrush[®], Eosin-Thiazin-Färbung, Balkenlänge 20 µm

4.3.2 Zytologische Parameter im Entnahmesystemvergleich

Bei der Entnahme mit dem Knudsen-Katheter waren 74 (35,7 %) der 207 Proben aufgrund einer unzureichenden Menge an Zellmaterial auf dem Objektträger nicht auswertbar, während nur zwei Proben (1 %) wegen zu starker Deformationen ausgeschlossen werden mussten. Die übrigen 131 (63,3 %) Ausstriche waren auswertbar. Beim CytologyBrush[®] hingegen fielen lediglich drei (1,4 %) von 218 Proben aufgrund von Geringzelligkeit aus der Auswertung, alle anderen (98,6 %) konnten gezählt werden. Der Uteruskulturtupfer lieferte sieben Proben (3,5 %) mit zu wenig Zellmaterial für eine aussagekräftige Untersuchung, weitere 37 Ausstriche (18,4 %) wiesen so starke Deformationen auf, dass eine Auswertung nicht möglich war. Die anderen 157 Proben (78,1 %) waren auswertbar (Tabelle 27).

Tabelle 27: Konfigurationsfrequenzanalyse der Auswertbarkeit der Proben (n = 626), der Erwartungswert steht in [], (UTP = Uteruskulturtupfer)

System	Nicht auswertbar, geringzellig	Nicht auswertbar, Deformationen	Auswertbar	Summe
Knudsen-Katheter	74 (35,7 %) [27,8] p < 0,0001	2 (1,0 %) [12,9] p = 0,0017	131 (63,3 %) [166,3] p < 0,0001	207
CytologyBrush®	3 (1,4 %) [29,3] p < 0,0001	0 (0 %) [13,6] p < 0,0001	215 (98,6 %) [175,23] p < 0,0001	218
UTP	7 (3,5 %) [27,0] p < 0,0001	37 (18,4 %) [12,5] p < 0,0001	157 (78,1 %) [161,5] p = 2,9	201
Summe	84	39	503	626

Die Nullhypothese - H_0 = die Auswertbarkeit ist unabhängig vom Entnahmesystem - konnte mit einem Chi-Quadrat-Wert von 207,7 und $p < 0,0001$ hochsignifikant abgelehnt werden. In der Konfigurationsfrequenzanalyse wurde deutlich, dass der Knudsen-Katheter signifikant mehr Proben liefert, die aufgrund von zu wenig Zellmaterial nicht auswertbar waren, als die beiden anderen Systeme. Der Uteruskulturtupfer hingegen verursachte signifikant mehr Deformationen an den Zellen, die ebenfalls dazu führten, dass mehr Proben nicht ausgewertet werden konnten, als nach Entnahme mit dem Knudsen-Katheter und dem CytologyBrush®. Daraus ergab sich, dass der CytologyBrush® mit Abstand den höchsten Anteil (98,6 %) an auswertbaren Proben brachte, während der Knudsen-Katheter mit 131 auswertbaren Ausstrichen (63,3 %) deutlich unter dem Erwartungswert von 166,3 lag. Auffällig war, dass die Gründe für nicht auswertbare Proben beim Knudsen-Katheter nahezu ausschließlich in unzureichenden Zellmengen auf dem Objektträger zu suchen waren, beim Uteruskulturtupfer dagegen in den starken Deformationen der Zellen.

Ergebnisse

Auch die Arbeitshypothese, dass die Verursachung von Deformationen an den Zellen unabhängig vom Entnahmesystem ist, musste mit einem Chi-Quadrat-Wert von 238,2 und einem $p < 0,0001$ abgelehnt werden. In der Konfigurationsfrequenzanalyse zeigte sich, dass mit dem Knudsen-Katheter mit 100 (76,3 %) von 131 und mit dem CytologyBrush[®] mit 159 (74 %) von 215 signifikant mehr Proben ohne Deformationen gewonnen werden konnten, als zu erwarten war. Im Uteruskulturtupfer wiesen lediglich 14 (8,9 %) von 157 Proben keine Deformationen auf, was somit deutlich unter dem Erwartungswert lag. Bei der Anzahl an Proben, an denen nur teilweise Deformationen festzustellen waren, wichen der CytologyBrush[®] mit 53 (24,7 %) Proben nicht signifikant, und der Knudsen-Katheter mit 23 (17,6 %) Proben nur knapp signifikant vom Erwartungswert ab. Beim Uteruskulturtupfer wurden mit 63 (40,1 %) signifikant mehr Zytologien mit Deformationen ausgewertet als zu erwarten war. Während die Anzahl an Ausstrichen, in denen die Zellen überwiegend deformiert waren, beim Knudsen-Katheter mit acht (6,1 %) und CytologyBrush[®] mit drei (1,3 %) sehr gering war, war die Anzahl beim Uteruskulturtupfer mit über 50 % der Proben ($n = 80$) signifikant höher als erwartet. Bei der Entnahme mit dem Uteruskulturtupfer konnten also nur bei knapp 10 % der Proben keine Deformationen festgestellt werden. Demgegenüber führten die Entnahme mit dem Knudsen-Katheter und CytologyBrush[®] jeweils nur bei 25 % der Proben zu Deformationen (Tabelle 28).

Tabelle 28: Konfigurationsfrequenzanalyse Morphologie der Zelldarstellung in den auswertbaren Ausstrichen (n = 503), [Erwartungswert], (UTP = Uteruskulturtupfer)

System	Keine Deformationen	Teilweise Deformationen	Überwiegend Deformationen	Summe
Knudsen-Katheter	100 (76,3 %) [71,1] p < 0,0001	23 (17,6 %) [36,2] p = 0,025	8 (6,1 %) [23,7] p = 0,0003	131
CytologyBrush	159 (74,0 %) [116,7] p < 0,0001	53 (24,7 %) [59,4] p = 1,8	3 (1,3 %) [38,9] p < 0,0001	215
UTP	14 (8,9 %) [85,2] p < 0,0001	63 (40,1 %) [43,4] p = 0,0002	80 (51,0 %) [28,4] p < 0,0001	157
Summe	273	139	91	503

Mit einem Chi-Quadrat-Wert von 163,5 und $p < 0,0001$ musste auch die Nullhypothese - H_0 = die Menge an Erythrozyten im Ausstrich ist unabhängig vom Entnahmesystem - abgelehnt werden. Im CytologyBrush® waren nur in 25 Ausstrichen keine Erythrozyten nachweisbar, was signifikant weniger war, als im Durchschnitt zu erwarten. Der Uteruskulturtupfer lieferte hingegen 112 (71,3 %) Ausstriche ohne Erythrozyten. Die Anzahl an Proben, in denen nur wenige Erythrozyten zu sehen waren, wichen weder beim Knudsen-Katheter mit 34 (26,0 %) noch beim CytologyBrush® mit 68 (31,6 %) und Uteruskulturtupfer mit 34 (21,7 %) signifikant vom Erwartungswert ab. Zytologien mit zahlreichen Erythrozyten wurden signifikant häufiger mit dem CytologyBrush® gewonnen (n = 83, 38,6 %), während der Knudsen-Katheter mit 17 (13,0 %) und der Uteruskulturtupfer mit 11 (7,0 %) signifikant weniger Proben als erwartet lieferten. Die Menge an Ausstrichen, bei denen massenhaft Erythrozyten zu sehen waren, wick beim Knudsen-Katheter mit 15 (11,4 %) nicht signifikant vom Erwartungswert ab, im Brush lag die Zahl mit 39 Proben (18,2 %) hoch signifikant über und beim Uteruskulturtupfer mit null Proben signifikant unter dem Erwartungswert (Tabelle 29).

Ergebnisse

Tabelle 29: Konfigurationsfrequenzanalyse Vorkommen von Erythrozyten in den auswertbaren Zytologien (n = 503), [Erwartungswert], (UTP = Uteruskulturtupfer)

System	Keine Erythrozyten	Wenige Erythrozyten	Zahlreich Erythrozyten	Massenhaft Erythrozyten	Summe
Knudsen-Katheter	65 (69,6 %) [52,5] p = 0,12	34 (26,0 %) [35,4] p = 8,9	17 (13,0 %) [28,9] p = 0,04	15 (11,4 %) [14,1] p = 9,1	131
CytologyBrush	25 (11,6 %) [86,3] p < 0,0001	68 (31,6 %) [58,1] p = 0,54	83 (38,6 %) [47,4] p < 0,0001	39 (18,2 %) [23,1] p < 0,0001	215
UTP	112 (71,3%) [63,0] p < 0,0001	34 (21,7 %) [42,4] p = 0,8	11 (7,0 %) [34,6] p < 0,0001	0 (0 %) [16,9] p < 0,0001	157
Summe	202	136	111	54	503

4.3.3 Paarvergleich der Entnahmesysteme

Knudsen-Katheter mit CytologyBrush®

Der Vergleich der zytologischen Ergebnisse von Knudsen-Katheter und CytologyBrush® wurde an 110 gepaarten Proben durchgeführt. Davon konnten 66 Probenpaare (60 %) ausgewertet werden, bei 44 Proben (40 %) war dies nicht möglich. Von diesen entfielen 43 (98 %) auf den Knudsen-Katheter, wobei 42 (98 %) aufgrund von zuwenig Zellmaterial und nur eine Probe (2 %) wegen Deformationen nicht berücksichtigt werden konnten. Lediglich ein Probenpaar (2 %) konnte wegen starker Zelldeformationen bei der Entnahme mit dem CytologyBrush® nicht berücksichtigt werden.

Die durchschnittliche Anzahl an Endometriumszellen pro Gesichtsfeld betrug beim Knudsen-Katheter $26,81 \pm 15,76$ (Median 22,57), im Vergleich zu durchschnittlich $47,91 \pm 14,42$ (Median 48,29) beim CytologyBrush® (Tabelle 30, Abbildung 27).

Tabelle 30: Endometriumszellen pro Gesichtsfeld (GF), angegeben als arithmetischer Mittelwert (x_a) mit Standardabweichung (s) und Median

System	$x_a \pm s$ Endometriumszellen/ GF	Median
Knudsen-Katheter	$26,81 \pm 15,76$	22,57
CytologyBrush®	$47,91 \pm 14,42$	48,29

Im Wilcoxon-Test erwies sich dieser Unterschied als statistisch hoch signifikant ($p < 0,0001$). Der CytologyBrush® wies also signifikant mehr Endometriumszellen pro Gesichtsfeld nach als der Knudsen-Katheter. Eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Anzahl an Endometriumszellen pro Gesichtsfeld im Knudsen-Katheter und CytologyBrush® war nicht nachweisbar ($r_s = 0,09$; $p = 0,43$).

Ergebnisse

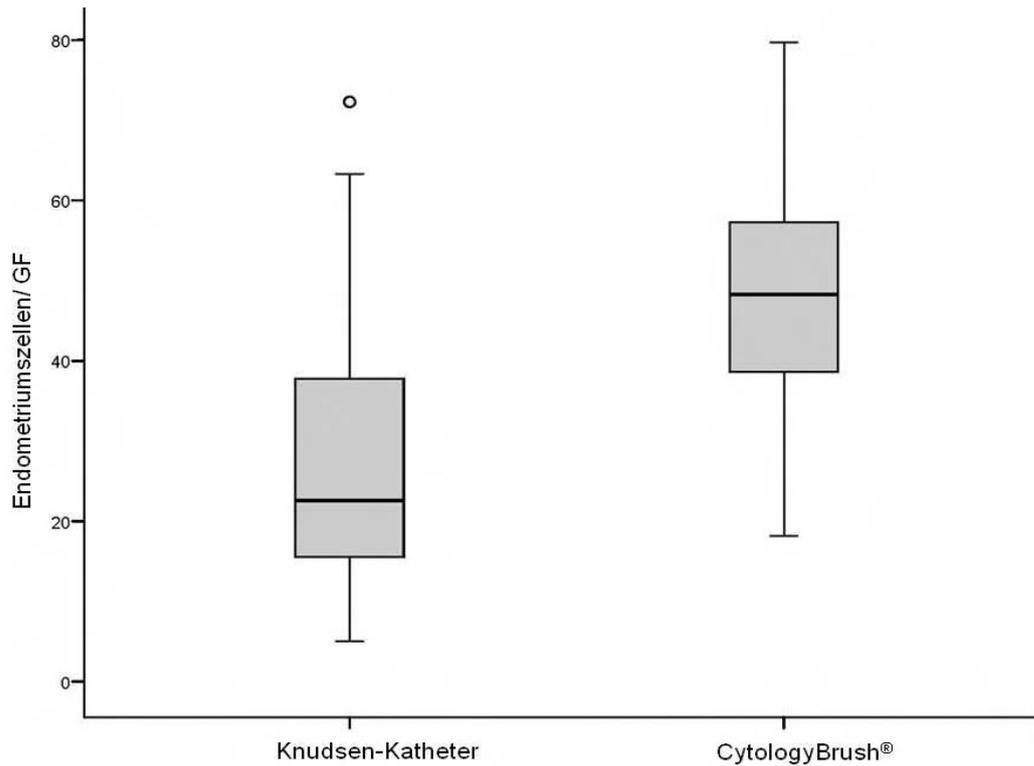


Abbildung 27: Endometriumszellen / Gesichtsfeld (GF), Knudsen-Katheter und CytologyBrush®, dargestellt als Box and Whisker Plot

Es konnten $5,27 \pm 14,72$ (Median 0) neutrophile Granulozyten pro Gesichtsfeld im Knudsen-Katheter (Abbildung 28) nachgewiesen werden, im CytologyBrush® (Abbildung 29) hingegen nur $2,45 \pm 10,55$ (Median 0) (Tabelle 31).

Tabelle 31: Neutrophile Granulozyten (PMN) pro Gesichtsfeld (GF), angegeben als arithmetischer Mittelwert (x_a) mit Standardabweichung (s) und Median

System	$x_a \pm s$ PMN/ GF	Median
Knudsen-Katheter	$5,27 \pm 14,72$	0
CytologyBrush®	$2,45 \pm 10,55$	0

Im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test zeigte sich, dass der Knudsen-Katheter signifikant ($p = 0,02$) mehr neutrophile Granulozyten pro Gesichtsfeld nachwies als der CytologyBrush®.

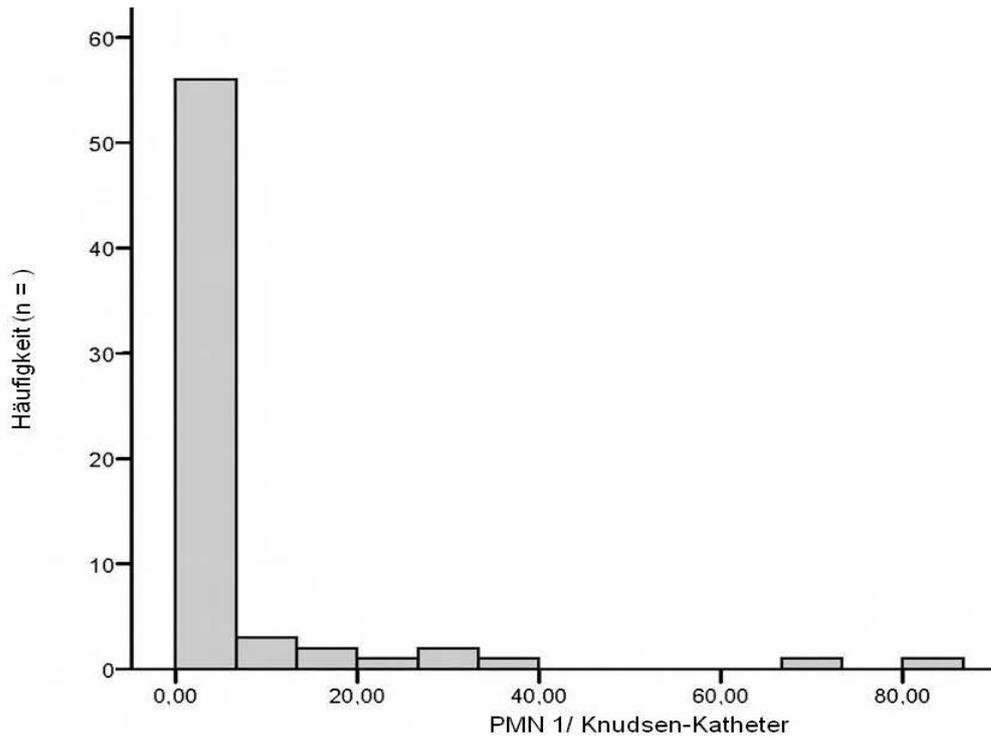


Abbildung 28: Anzahl neutrophiler Granulozyten pro Gesichtsfeld (PMN 1), Entnahme mit dem Knudsen-Katheter

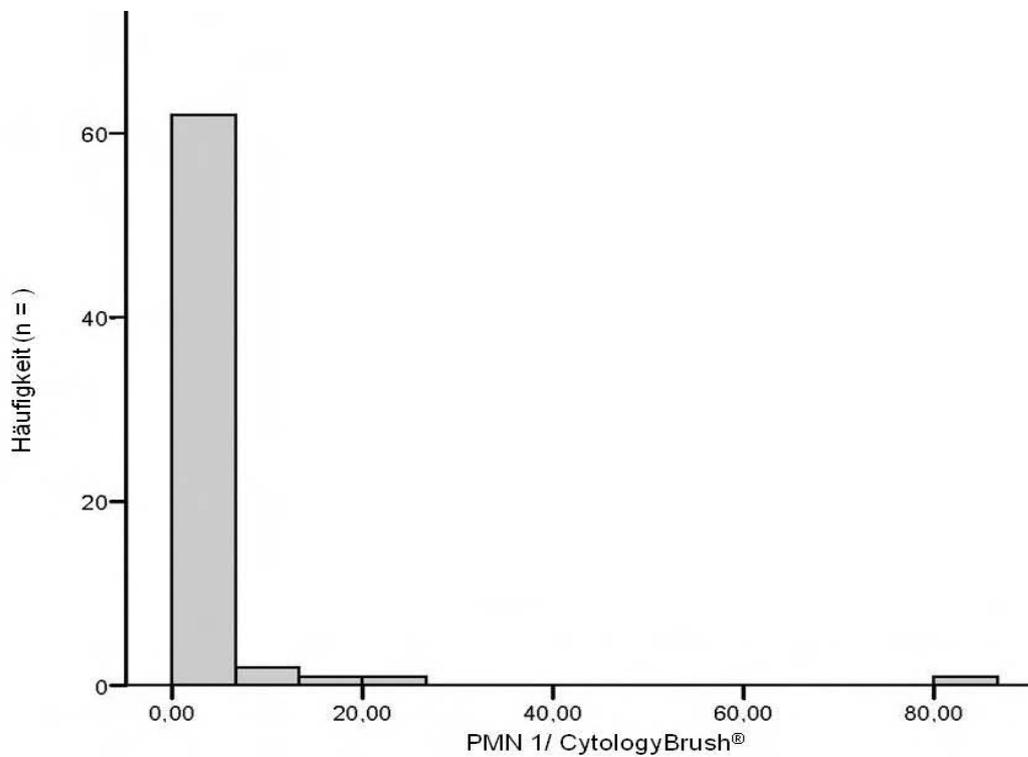


Abbildung 29: Anzahl neutrophiler Granulozyten pro Gesichtsfeld (PMN 1), Entnahme mit dem CytologyBrush®

Ergebnisse

Da unter Praxisbedingungen zytologische Auswertungen häufig nur in positiv (neutrophile Granulozyten nachweisbar) oder negativ (keine Entzündungszellen nachweisbar) eingeteilt werden, wurde eine zusätzliche Auswertung vorgenommen und die Systeme erneut miteinander verglichen (Tabelle 33). Dabei galt ein Befund von über 0,5 % neutrophile Granulozyten bezogen auf die Gesamtzellzahl im Ausstrich als positiv (Ricketts und Mackintosh, 1987).

In 16 Fällen (24 %) konnten in beiden Systemen Entzündungszellen nachgewiesen werden, bei 29 Probenpaaren (44 %) war das Ergebnis übereinstimmend negativ. In 14 Proben (21 %) erbrachten der Knudsen-Katheter ein positives und der CytologyBrush® ein negatives Ergebnis, umgekehrt war dies nur bei 7 Proben (11 %) der Fall.

Tabelle 33: Ergebnis der Endometriumszytologien beim Vergleich zwischen Knudsen-Katheter und CytologyBrush (Brush) (PMN = neutrophile Granulozyten; + = Zytologie positiv, - = Zytologie negativ)

PMN		Knudsen-Katheter		Summe
		+	-	
Brush	+	16 (24 %)	7 (11 %)	23
	-	14 (21 %)	29 (44 %)	43
Summe		30	36	66

Die Werte wurden in der Vierfeldertafel dargestellt und mit dem zweiseitigen Chi-Quadrat-Test geprüft, ob der Nachweis von neutrophilen Granulozyten unabhängig vom Entnahmesystem ist. Diese Hypothese konnte mit einem Chi-Quadrat-Wert von 8,27 und $p = 0,004$ abgelehnt werden.

Allerdings zeigte sich bei der Prüfung auf Symmetrie im McNemar-Test keine signifikante Abweichung ($p = 0,185$), so dass statistisch nicht bewiesen werden konnte, dass der Knudsen-Katheter signifikant häufiger ein positives Ergebnis bringt.

Knudsen-Katheter mit Uteruskulturtupfer

Für den Vergleich der zytologischen Ergebnisse von Knudsen-Katheter und Uteruskulturtupfer wurden 90 Probenpaare ausgewertet. In die Untersuchung konnten 43 Probenpaare (48 %) aufgenommen werden, 47 Proben (52 %) mussten ausgeschlossen werden. Von den 47 ausgeschlossenen Probenpaaren war bei 37 (79 %) eine ungenügende Menge an Zellmaterial im Knudsen-Katheter die Ursache. Bei 10 Proben (11 %) war eine Analyse aufgrund von Deformationen (n = 8) oder Geringzelligkeit (n = 2) im Uteruskulturtupfer nicht möglich.

Die durchschnittliche Anzahl an Endometriumszellen pro Gesichtsfeld betrug beim Knudsen-Katheter $21,22 \pm 15,14$ (Median 15,86), im Vergleich zu durchschnittlich $19,15 \pm 7,81$ (Median 17,71) beim Uteruskulturtupfer (Tabelle 34, Abbildung 30).

Tabelle 34: Endometriumszellen pro Gesichtsfeld (GF), angegeben als arithmetischer Mittelwert (x_a) mit Standardabweichung (s) und Median

System	$x_a \pm s$ Endometriumszellen/ GF	Median
Knudsen-Katheter	$21,22 \pm 15,14$	15,86
Uteruskulturtupfer	$19,15 \pm 7,81$	17,71

Der Unterschied in der Menge an Endometriumszellen pro Gesichtsfeld zwischen Knudsen-Katheter und Uteruskulturtupfer war statistisch nicht signifikant ($p = 0,89$). Eine Korrelation bezüglich dieses Parameters bestand ebenfalls nicht ($r_s = 0,26$; $p = 0,09$).

Ergebnisse

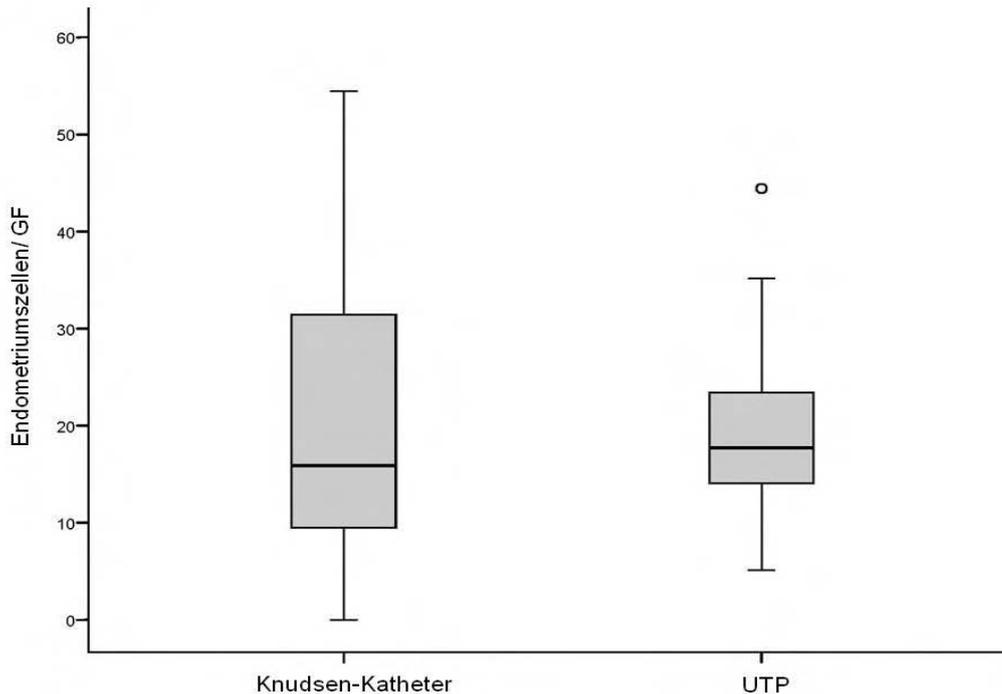


Abbildung 30: Endometriumszellen / Gesichtsfeld (GF), Knudsen-Katheter und Uteruskulturtupfer (UTP), dargestellt als Box and Whisker Plot

Es konnten durchschnittlich $5,52 \pm 14,75$ (Median 0,14) neutrophile Granulozyten pro Gesichtsfeld nach Ausstrich mit dem Knudsen-Katheter (Abbildung 31) ausgezählt werden, im Uteruskulturtupfer (Abbildung 32) nur $0,53 \pm 3,16$ (Median 0) (Tabelle 35).

Tabelle 35: Neutrophile Granulozyten (PMN) pro Gesichtsfeld (GF), angegeben als arithmetischer Mittelwert (x_a) mit Standardabweichung (s) und Median

System	$x_a \pm s$ PMN/ GF	Median
Knudsen-Katheter	$5,52 \pm 14,75$	0,14
Uteruskulturtupfer	$0,53 \pm 3,16$	0

Mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test konnte belegt werden, dass der Knudsen-Katheter hoch signifikant mehr neutrophile Granulozyten pro Gesichtsfeld nachwies als der Uteruskulturtupfer ($p < 0,0001$).

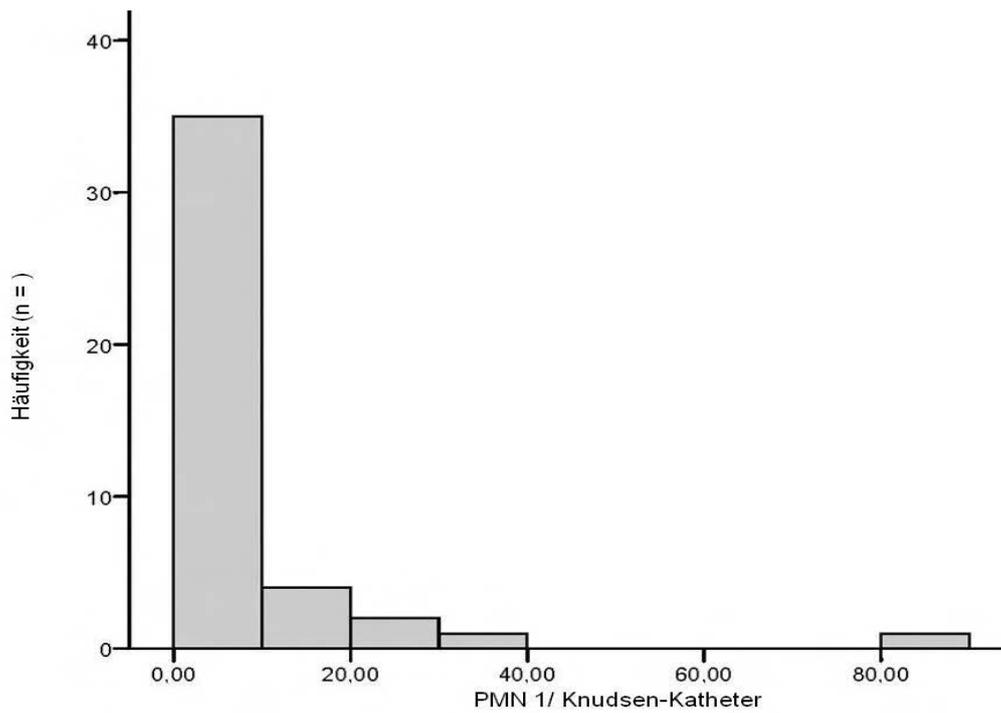


Abbildung 31: Anzahl neutrophiler Granulozyten pro Gesichtsfeld (PMN 1), Entnahme mit dem Knudsen-Katheter

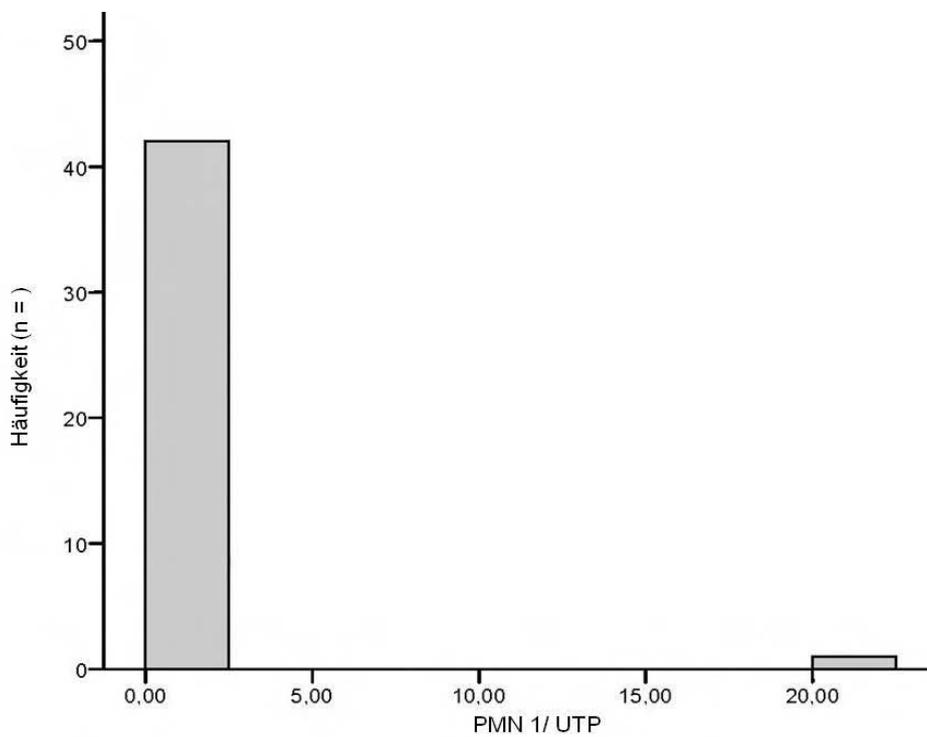


Abbildung 32: Anzahl neutrophiler Granulozyten pro Gesichtsfeld (PMN 1), Entnahme mit dem Uteruskulturtupfer (UTP)

Ergebnisse

Bei der Einteilung der Ausstriche in zytologisch positiv oder negativ brachten in fünf Fällen (12 %) beide Proben ein positives Ergebnis. In 22 Ausstrichen (51 %) konnten mit keinem der beiden Verfahren Entzündungszellen nachgewiesen werden. Bei 16 Zytologien (37 %) war das Ergebnis im Knudsen-Katheter positiv, im Uteruskulturtupfer hingegen negativ, während in keinem Fall der Uteruskulturtupfer neutrophile Granulozyten nachweisen konnte, wenn das Ergebnis im Knudsen-Katheter negativ war (Tabelle 37).

Tabelle 37: Ergebnis der Endometriumszytologien beim Vergleich zwischen Knudsen-Katheter und Uteruskulturtupfer (UTP) (PMN = neutrophile Granulozyten; + = Zytologie positiv, - = Zytologie negativ)

PMN		Knudsen-Katheter		Summe
		+	-	
UTP	+	5 (12 %)	0 (0 %)	5
	-	16 (37 %)	22 (51 %)	38
Summe		21	22	43

Die Werte wurden in einer Vierfeldertafel dargestellt und im zweiseitigen exakten Test nach Fisher geprüft. Die Abweichung von der Nullhypothese - H_0 = der Nachweis von neutrophilen Granulozyten ist unabhängig vom Entnahmesystem - war statistisch signifikant ($p = 0,02$).

Bei der Prüfung auf Symmetrie im McNemar-Test zeigte sich, dass der Knudsen-Katheter hoch signifikant ($p < 0,0001$) häufiger ein positives zytologisches Ergebnis brachte als der Uteruskulturtupfer.

CytologyBrush® mit Uteruskulturtupfer

Für den Vergleich der zytologischen Ergebnisse von CytologyBrush® und Uteruskulturtupfer wurden 118 Probenpaare untersucht. Davon konnten 89 Probenpaare (75 %) ausgewertet werden, bei 29 Proben (25 %) war dies nicht möglich. Von den 29 nicht auswertbaren Proben konnten zwei (7 %) aufgrund von zuwenig Zellmaterial im CytologyBrush® nicht ausgezählt werden, die anderen 27 (93 %) Paare mussten aufgrund von Deformationen ($n = 23 / 85 \%$) oder zuwenig Zellmaterial ($n = 4 / 15 \%$) im Uteruskulturtupfer von der Untersuchung ausgeschlossen werden.

Die durchschnittliche Anzahl an Endometriumszellen pro Gesichtsfeld beim CytologyBrush® lag bei $45,76 \pm 15,75$ (Median 45,64), beim Uteruskulturtupfer bei $19,55 \pm 9,93$ (Median 17,07) (Tabelle 38, Abbildung 33).

Tabelle 38: Endometriumszellen pro Gesichtsfeld (GF), angegeben als arithmetischer Mittelwert (x_a) mit Standardabweichung (s) und Median

System	$x_a \pm s$ Endometriumszellen/ GF	Median
CytologyBrush®	$45,76 \pm 15,75$	45,64
Uteruskulturtupfer	$19,55 \pm 9,93$	17,07

Der CytologyBrush® wies hoch signifikant mehr Endometriumszellen pro Gesichtsfeld nach als der Uteruskulturtupfer ($p < 0,0001$). Die Anzahl der Endometriumszellen pro Gesichtsfeld beim CytologyBrush® und Uteruskulturtupfer zeigten eine signifikant positive Korrelation ($r_s = 0,31$; $p = 0,003$) (Abbildung 34).

Ergebnisse

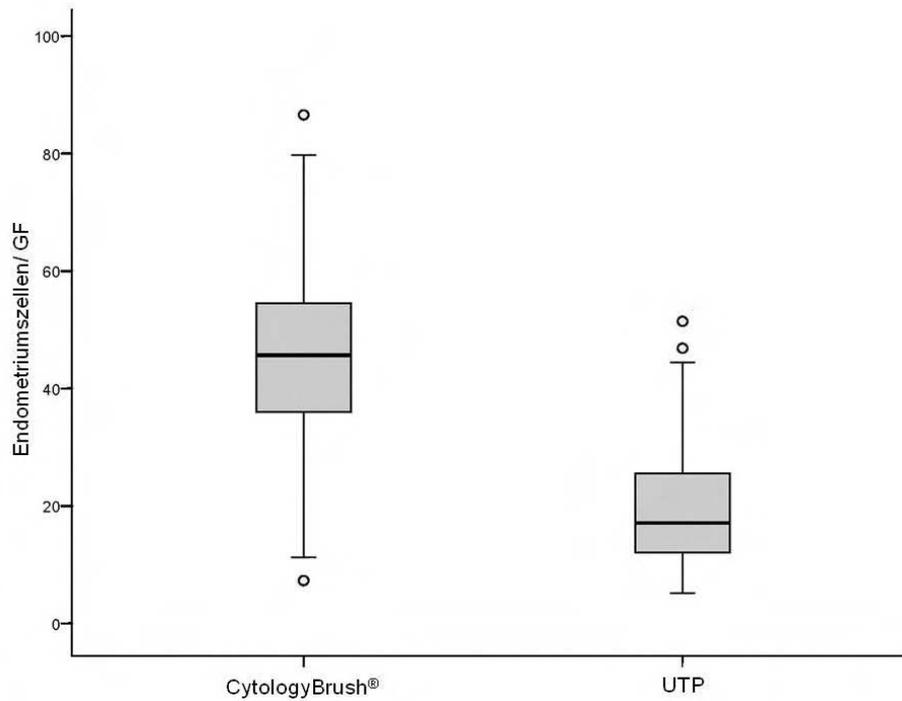


Abbildung 33: Endometriumzellen pro Gesichtsfeld (GF), „CytologyBrush®“ und Uteruskulturtupfer (UTP), dargestellt als Box and Whisker Plot

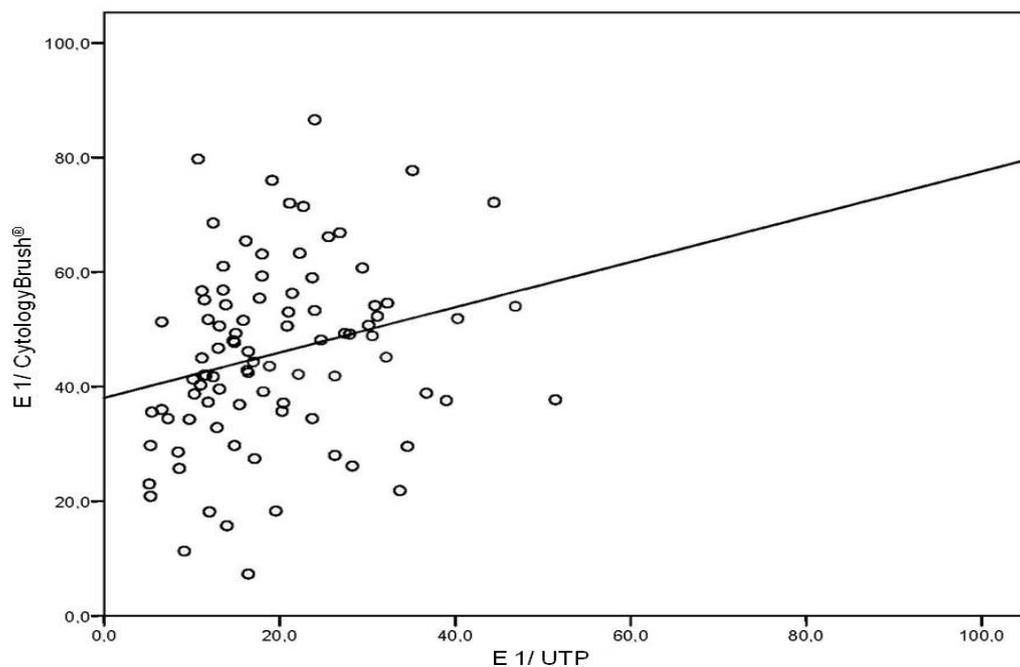


Abbildung 34: Zusammenhang zwischen der Anzahl an Endometriumzellen pro Gesichtsfeld (E1) in CytologyBrush® und Uteruskulturtupfer. Die Korrelation war statistisch signifikant ($r_s = 0,31$, $p = 0,003$).

Mit dem CytologyBrush® wurden durchschnittlich $4,35 \pm 11,74$ (Median 0,29) neutrophile Granulozyten pro Gesichtsfeld ausgezählt (Abbildung 35), mit dem Uteruskulturtupfer hingegen nur $0,57 \pm 2,88$ (Median 0) (Tabelle 39, Abbildung 36).

Tabelle 39: Anzahl neutrophiler Granulozyten pro Gesichtsfeld (GF), angegeben als arithmetischer Mittelwert (\bar{x}_a) mit Standardabweichung (s) und Median, Entnahme mit CytologyBrush® und Uteruskulturtupfer

System	$\bar{x}_a \pm s$ PMN/ GF	Median
CytologyBrush®	$4,34 \pm 11,78$	0,29
Uteruskulturtupfer	$0,58 \pm 2,90$	0

Dieser Unterschied erwies sich im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test als statistisch hoch signifikant ($p < 0,0001$).

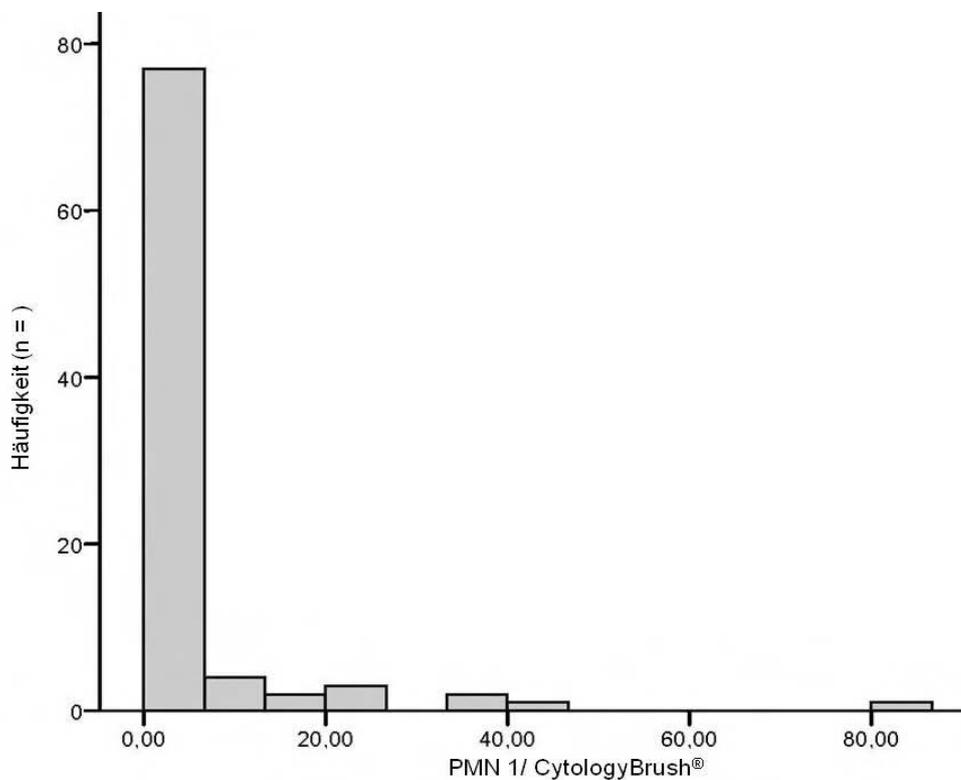


Abbildung 35: Anzahl neutrophiler Granulozyten pro Gesichtsfeld (PMN 1), Entnahme mit dem CytologyBrush®

Ergebnisse

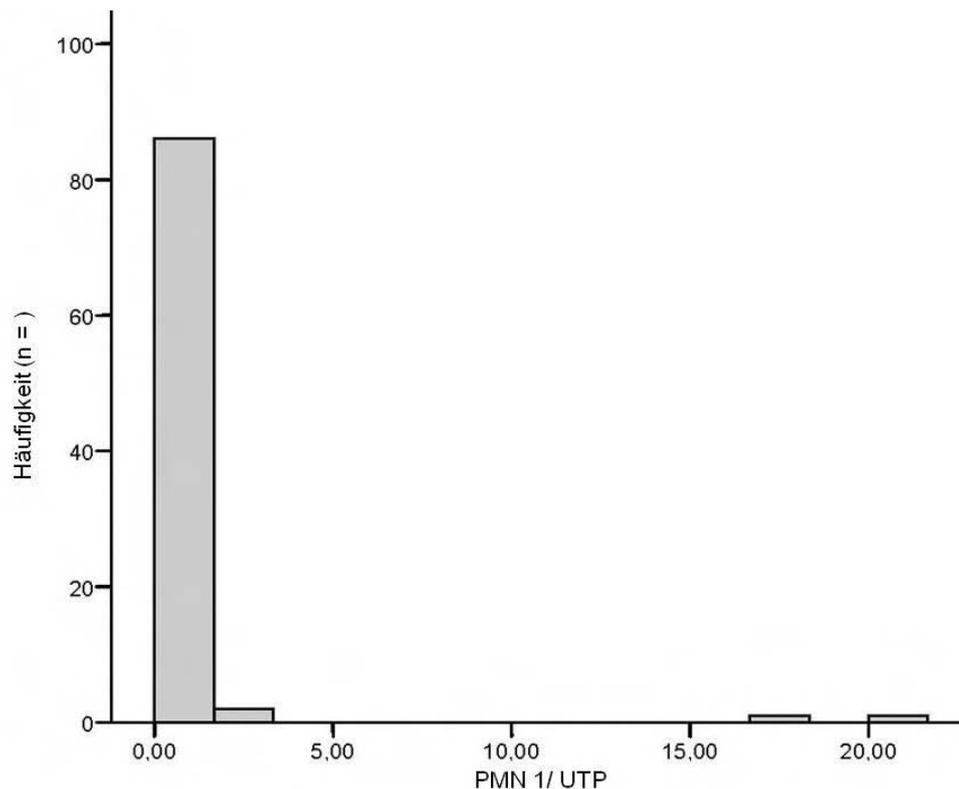


Abbildung 36: Anzahl neutrophiler Granulozyten pro Gesichtsfeld (PMN 1), Entnahme mit dem Uteruskulturtupfer (UTP)

Bei der Einteilung der Ausstriche in zytologisch positiv oder negativ war das Ergebnis in 18 Fällen (20%) in beiden Systemen positiv. In 44 Fällen (50 %) waren in beiden Systemen keine Entzündungszellen nachweisbar. In 27 Proben (30 %) war das Ergebnis im Brush positiv, im Uteruskulturtupfer jedoch negativ. Der Fall, dass das Ergebnis im CytologyBrush® negativ, aber im Uteruskulturtupfer positiv war, trat nicht auf (Tabelle 41).

Tabelle 41: Ergebnis der Endometriumszytologien beim Vergleich zwischen CytologyBrush[®] und Uteruskulturtupfer (UTP) (PMN = neutrophile Granulozyten; + = Zytologie positiv, - = Zytologie negativ)

PMN		CytologyBrush [®]		Summe
		+	-	
UTP	+	18 (20 %)	0 (0 %)	18
	-	27 (30 %)	44 (50 %)	71
Summe		45	44	89

Die Werte wurden in einer Vierfeldertafel dargestellt und im zweiseitigen Chi-Quadrat-Test auf Unabhängigkeit geprüft. Die Abweichung von der Nullhypothese - H_0 = der Nachweis von neutrophilen Granulozyten ist unabhängig vom System - war statistisch hoch signifikant ($p < 0,0001$).

Bei der Prüfung auf Symmetrie im McNemar-Test zeigte sich, dass der CytologyBrush[®] hoch signifikant ($p < 0,0001$) häufiger ein positives zytologisches Ergebnis aufwies als der Uteruskulturtupfer.

4.4 Zusammenhang zwischen zytologischer Untersuchung und Daten aus Anamnese und gynäkologischer Untersuchung

Anamnese - Zytologie mit Knudsen-Katheter

Von 19 untersuchten Stuten mit Fohlen bei Fuß wiesen acht (42 %) ein negatives und 11 (58 %) ein positives zytologisches Ergebnis auf. Bei Stuten, die ein oder mehrere Jahre nicht besamt worden waren, war die Zytologie in acht Fällen (50 %) negativ und in acht Fällen (50 %) positiv. Ähnlich war der Befund bei den güt gebliebenen Stuten, wo 24 (57 %) einen negativen und 18 (43 %) einen positiven Befund aufwiesen. Demgegenüber konnten bei 22 (71 %) von 31 Maidenstuten keine neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden, nur neun von ihnen (29 %) zeigten Entzündungsanzeichen. Bei Stuten mit Trächtigkeitsstörungen hingegen waren 15 (68 %) von 22 untersuchten zytologisch positiv und sieben (32 %) zytologisch negativ (Tabelle 42).

Ergebnisse

Tabelle 42: Zytologische Untersuchung (ZU) der exfoliativen Endometriumszytologien in Bezug zur Anamnese der Stuten (n = 130), Entnahme mit Knudsen-Katheter

	Fohlenstuten	Maidenstuten	Güste Stuten	Stuten mit Trächtigkeitsstörungen	Nicht besamte Stuten	Summe
ZU negativ	8 (42 %)	22 (71 %)	24 (57 %)	7 (32 %)	8 (50 %)	69 (53 %)
ZU - positiv	11 (58 %)	9 (29 %)	18 (43 %)	15 (68 %)	8 (50 %)	61 (47 %)
Summe	19	31	42	22	16	130

Die Ergebnisse wurden dahingehend geprüft, ob bestimmte Stutengruppen häufiger ein positives zytologisches Ergebnis aufweisen als andere. Der Pearson-Chi-Quadrat-Test ergab ein knapp nicht signifikantes Ergebnis ($p = 0,056$). Trotzdem war auffällig, dass bei Fohlenstuten mit 58 % und Stuten mit Trächtigkeitsstörungen mit 68 % häufiger Entzündungszellen in den Ausstrichen zu finden waren, als beim Durchschnitt (47 %). Maidenstuten hatten den mit Abstand geringsten Anteil an positiven Zytologien (29 %).

Anamnese – Zytologie mit CytologyBrush®

Stuten mit Fohlen bei Fuß wiesen mit einem Prozentanteil von 56 % ($n = 15$) am häufigsten ein positives zytologisches Ergebnis auf. 35 Maidenstuten (67 %) hatten keinen zytologisch auffälligen Befund, bei 17 (33 %) war der Befund positiv. Bei den güsten Stuten konnten bei 51 Stuten (63 %) keine Entzündungszellen gefunden werden, bei 30 (37 %) waren welche zu detektieren. Von 23 Stuten mit Trächtigkeitsstörungen zeigten 14 (61 %) keine neutrophilen Granulozyten im Ausstrich, bei neun (39 %) war der Nachweis positiv. Ähnlich stellte es sich bei den nicht besamten Stuten dar, wo 21 Stuten (66 %) negative und 11 Stuten (34 %) positive Ausstriche aufwiesen (Tabelle 43).

Tabelle 43: Zytologische Untersuchung (ZU) der exfoliativen Endometriumszytologien in Bezug zur Anamnese der Stuten (n = 215), Entnahme mit CytologyBrush®

	Fohlenstuten	Maidenstuten	Güste Stuten	Stuten mit Trächtigkeitsstörungen	Nicht besamte Stuten	Summe
ZU negativ	12 (44 %)	35 (67 %)	51 (63 %)	14 (61 %)	21 (66 %)	133 (62 %)
ZU positiv	15 (56 %)	17 (33 %)	30 (37 %)	9 (39 %)	11 (34 %)	82 (38 %)
Summe	27	52	81	23	32	215

Es wurde geprüft, ob bestimmte Stutengruppen häufiger ein positives zytologisches Ergebnis aufweisen als andere. Das Ergebnis des Pearson-Chi-Quadrat-Tests war nicht statistisch signifikant ($p = 0,36$).

Anamnese – Zytologie mit Uteruskulturtupfer

Bei der Untersuchung mit dem Uteruskulturtupfer wiesen von 36 Maidenstuten 32 (89 %) ein negatives und nur vier (11 %) ein positives zytologisches Ergebnis auf. Von 64 güsten Stuten war die Zytologie in 51 Fällen (80 %) negativ und in 13 Fällen (20 %) positiv. Bei 17 Stuten mit Trächtigkeitsstörungen ließen sich nur bei zwei Stuten (12 %) Entzündungszellen nachweisen, bei den anderen 15 (88 %) hingegen nicht. Die 19 Stuten, die ein- oder mehrjährig nicht besamt worden waren, wiesen zu 95 % ($n = 18$) negative Zytologien auf, nur eine Stute war positiv (5 %). Bei den Stuten mit Fohlen bei Fuß konnten bei 33 % ($n = 7$) neutrophile Granulozyten gefunden werden und bei 14 Stuten (67 %) nicht.

Bei diesem Entnahmesystem war der Anteil an negativen Zytologien deutlich höher (83 %) als beim Knudsen-Katheter (53 %) und CytologyBrush® (62 %). Dennoch wiesen auch hier die Fohlenstuten am häufigsten positive zytologische Befunde auf (Tabelle 44).

Ergebnisse

Tabelle 44: Zytologische Untersuchung (ZU) der exfoliativen Endometriumszytologien in Bezug zur Anamnese der Stuten (n = 157), Entnahme mit Uteruskulturtupfer

	Fohlen- stuten	Maiden- stuten	Güste Stuten	Stuten mit Trächtigkeits- störungen	Nicht besamte Stuten	Summe
ZU negativ	14 (67 %)	32 (89 %)	51 (80 %)	15 (88 %)	18 (95 %)	130 (83 %)
ZU positiv	7 (33 %)	4 (11 %)	13 (20 %)	2 (12 %)	1 (5 %)	27 (17 %)
Summe	21	36	64	17	19	157

Die Ergebnisse wurden mit dem verallgemeinerten Fisher-Test nach dem Freeman-Halton-Prinzip dahingehend geprüft, ob der Anteil an positiven Zytologien unabhängig von der Vorgeschichte war. Diese Hypothese konnte statistisch nicht signifikant widerlegt werden ($p=0,14$).

Zyklusstand – Zytologie mit Knudsen-Katheter

Es wurden lediglich zwei Proben von Stuten in der Fohlenrosse entnommen, von denen eine (50 %) ein positives zytologisches Ergebnis aufwies und eine (50 %) ein negatives. Von 102 Stuten im Östrus waren 52 (51 %) zytologisch positiv und 50 (49 %) zytologisch negativ. Bei 16 Stuten (62 %) im Diöstrus fanden sich keine Entzündungszellen, bei zehn Stuten aus dieser Gruppe (38 %) waren neutrophile Granulozyten nachzuweisen (Tabelle 45).

Tabelle 45: Zytologische Untersuchung (ZU) der exfoliativen Endometriumszytologien in Bezug zum Zyklusstand (n = 130), Entnahme mit Knudsen-Katheter

	Fohlenrosse	Östrus	Diöstrus	Summe
ZU negativ	1 (50 %)	52 (51 %)	16 (62 %)	69 (53 %)
ZU positiv	1 (50 %)	50 (49 %)	10 (38 %)	61 (47 %)
Summe	2	102	26	130

Die Ergebnisse wurden mit dem verallgemeinerten Fisher-Test nach dem Freeman-Halton-Prinzip geprüft, ob der Anteil an positiven Zytologien unabhängig vom Zyklusstand war. Diese Hypothese konnte statistisch nicht widerlegt werden ($p = 0,69$).

Zyklusstand – Zytologie mit CytologyBrush®

Bei der Entnahme mit dem CytologyBrush® wurden sieben Stuten in der Fohlenrosse beprobt. Davon wiesen drei Stuten (43 %) keine Entzündungszellen auf, während bei vier Stuten (57 %) welche nachgewiesen werden konnten. Im Östrus kamen bei 63 Stuten (38 %) neutrophile Granulozyten vor, bei 103 (62 %) nicht. Von 42 Stuten, die im Diöstrus beprobt wurden, war das zytologische Ergebnis bei 27 Stuten (64 %) negativ und bei 15 Stuten (36 %) positiv (Tabelle 46).

Tabelle 46: Zytologische Untersuchung (ZU) der exfoliativen Endometriumszytologien in Bezug zum Zyklusstand (n = 215), Entnahme mit dem CytologyBrush®

	Fohlenrosse	Östrus	Diöstrus	Summe
ZU negativ	3 (43 %)	103 (62 %)	27 (64 %)	133 (62 %)
ZU positiv	4 (57 %)	63 (38 %)	15 (36 %)	82 (38 %)
Summe	7	166	42	215

Ergebnisse

Der verallgemeinerte Fisher-Test nach dem Freeman-Halton-Prinzip brachte kein statistisch signifikantes Ergebnis ($p = 0,62$).

Zyklusstand – Zytologie mit Uteruskulturtupfer

Mit dem Uteruskulturtupfer wurden 129 Stuten im Östrus untersucht. Bei 109 (84 %) waren keine Entzündungszellen im Ausstrich zu sehen, bei 20 (16 %) konnten welche nachgewiesen werden. Im Diöstrus war die Verteilung mit 20 Stuten (80 %) mit negativem und fünf Stuten (20 %) mit positivem Befund ähnlich. In der Fohlenrosse hingegen hatten von drei Stuten zwei (67 %) ein positives und eine (33 %) ein negatives Ergebnis (Tabelle 47).

Tabelle 47: Zytologische Untersuchung (ZU) der exfoliativen Endometriumszytologien in Bezug zum Zyklusstand ($n = 157$), Entnahme mit Uteruskulturtupfer

	Fohlenrosse	Östrus	Diöstrus	Summe
ZU negativ	1 (33 %)	109 (84 %)	20 (80 %)	130 (83%)
ZU positiv	2 (67 %)	20 (16 %)	5 (20 %)	27 (17 %)
Summe	3	129	25	157

Mit dem verallgemeinerten Fisher-Test nach dem Freeman-Halton-Prinzip wurde die Unabhängigkeit des positiven Nachweises von neutrophilen Granulozyten vom Zyklusstand geprüft. Das Ergebnis war nicht signifikant ($p = 0,07$).

Statistisch konnte nicht bewiesen werden, dass einer der drei Zyklusstände Fohlenrosse, Östrus oder Diöstrus einen signifikanten Einfluss auf den zytologischen Befund ausübt. Allerdings lässt sich aus den Ergebnissen ablesen, dass Stuten, von denen in der Fohlenrosse Probenmaterial für eine zytologische Untersuchung gewonnen wurde, häufiger Entzündungszellen aufwiesen als Stuten, die im Östrus

oder Diöstrus untersucht wurden. Zu berücksichtigen sind allerdings die sehr geringen Fallzahlen von Stuten in der Fohlenrosse.

Zysten – Zytologie mit Knudsen-Katheter

Von 120 Stuten, bei denen in der gynäkologischen Untersuchung keine Zysten festgestellt werden konnten, waren 67 (56 %) in der Zytologie unauffällig, während bei 53 (44 %) Entzündungszellen detektiert werden konnten. Stuten mit Zysten wiesen dagegen zu 80 % (n = 8) einen positiven Befund auf, nur 20 % (n = 2) waren negativ (Tabelle 48).

Tabelle 48: Zytologische Untersuchung (ZU) der Endometriumszytologien bei Stuten mit Nachweis von Zysten in der gynäkologischen Untersuchung (n = 130), Entnahme mit Knudsen-Katheter

	Keine Zysten	Zysten	Summe
ZU negativ	67 (56 %)	2 (20 %)	69 (53 %)
ZU positiv	53 (44 %)	8 (80 %)	61 (47 %)
Summe	120	10	130

Im zweiseitigen exakten Test nach Fisher wurde die Nullhypothese - H_0 = der Nachweis von neutrophilen Granulozyten ist unabhängig von Zysten im Uterus - geprüft. Diese Hypothese musste signifikant abgelehnt werden ($p = 0,04$).

Im McNemar-Test zeigte sich, dass bei Stuten mit Zysten hoch signifikant häufiger Entzündungszellen nachgewiesen werden konnten als bei Stuten ohne Zysten ($p < 0,0001$).

Ergebnisse

Zysten – Zytologie mit CytologyBrush®

Bei der Untersuchung mit dem CytologyBrush® konnten bei 119 Stuten (60 %) ohne Zysten keine und bei 79 Stuten (40 %) Entzündungszellen aufgezeigt werden. Stuten mit Zysten waren zu 82 % (n = 14) zytologisch negativ, nur drei (18 %) hatten ein positives Ergebnis aufzuweisen (Tabelle 49).

Tabelle 49: Zytologische Untersuchung (ZU) der Endometriumszytologien bei Stuten mit Nachweis von Zysten in der gynäkologischen Untersuchung (n = 215), Entnahme mit CytologyBrush®

	Keine Zysten	Zysten	Summe
ZU negativ	119 (60 %)	14 (82 %)	133 (62 %)
ZU positiv	79 (40 %)	3 (18 %)	82 (38 %)
Summe	198	17	215

Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit dem Knudsen-Katheter waren die Stuten mit Zysten im CytologyBrush® zu 82 % zytologisch negativ und nur 18 % positiv. Dieser Befund war allerdings statistisch nicht signifikant ($p = 0,07$).

Zysten – Zytologie mit Uteruskulturtupfer

Entzündungszellen waren bei Stuten ohne Zysten nur bei 24 (16 %) von 148 Stuten nachzuweisen. Bei Stuten mit Zysten konnten dagegen in 33 % der Fälle (n = 39) neutrophile Granulozyten nachgewiesen werden, 66 % (n = 6) waren zytologisch negativ (Tabelle 50).

Tabelle 50: Zytologische Untersuchung (ZU) der Endometriumszytologien bei Stuten mit Nachweis von Zysten in der gynäkologischen Untersuchung (n = 157), Entnahme mit Uteruskulturtupfer

	Keine Zysten	Zysten	Summe
ZU negativ	124 (84 %)	6 (67 %)	130 (83 %)
ZU positiv	24 (16 %)	3 (33 %)	27 (17 %)
Summe	148	9	157

Der Unterschied im Pearson-Chi-Quadrat-Test war statistisch nicht signifikant ($p = 0,19$).

Intrauterine Flüssigkeit – Zytologie mit Knudsen-Katheter

Das zytologische Ergebnis war bei 62 (55 %) von 112 Stuten ohne Flüssigkeit negativ und bei 50 Stuten (45 %) positiv. Stuten mit Flüssigkeitsansammlungen unter 2 cm Durchmesser hatten zu 50 % (n = 5) eine positive Zytologie. Überdurchschnittlich viele positive Nachweise gab es bei Stuten mit über 2 cm Flüssigkeit, wo von acht Stuten sechs (75 %) positiv waren (Tabelle 51).

Tabelle 51: Zytologische Untersuchung (ZU) der Endometriumszytologien in Bezug zu intrauterinen Flüssigkeitsansammlungen (n = 130), Entnahme mit Knudsen-Katheter

	Keine Flüssigkeit	Flüssigkeit < 2 cm ø	Flüssigkeit > 2 cm ø	Summe
ZU negativ	62 (55 %)	5 (50 %)	2 (25 %)	69 (53 %)
ZU positiv	50 (45 %)	5 (50 %)	6 (75 %)	61 (47 %)
Summe	112	10	8	130

Der Unterschied war statistisch nicht signifikant (Fisher-Test, $p = 0,23$).

Ergebnisse

Intrauterine Flüssigkeit – Zytologie mit CytologyBrush®

Der Anteil an Stuten mit negativem zytologischen Befund lag bei Stuten ohne Flüssigkeitsansammlungen bei 62 % (n = 116), bei Flüssigkeitsansammlungen < 2 cm bei 64 % (n = 7) und bei Stuten > 2 cm Flüssigkeit bei 59 % (n = 10). Positive Befunde wiesen 71 Stuten (38 %) ohne intrauterine Flüssigkeit, vier Stuten (36 %) mit Flüssigkeit < 2 cm und sieben Stuten (41 %) mit Flüssigkeit > 2 cm auf (Tabelle 52).

Tabelle 52: Zytologische Untersuchung (ZU) der Endometriumszytologien in Bezug zu intrauterinen Flüssigkeitsansammlungen (n = 215), Entnahme mit CytologyBrush®

	Keine Flüssigkeit	Flüssigkeit < 2 cm ø	Flüssigkeit > 2 cm ø	Summe
ZU negativ	116 (62 %)	7 (64 %)	10 (59 %)	133 (62 %)
ZU positiv	71 (38 %)	4 (36 %)	7 (41 %)	82 (38 %)
Summe	187	11	17	215

Mit dem Pearson-Chi-Quadrat-Test konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Stuten mit Flüssigkeitsansammlung und ohne nachgewiesen werden (p = 0,95).

Intrauterine Flüssigkeit – Zytologie mit Uteruskulturtupfer

Der Anteil an positiven Zytologien war insgesamt deutlich geringer als bei den anderen beiden Entnahmesystemen. So waren nur bei 15 % (n = 21) der Stuten ohne Flüssigkeit und 25 % (n = 2) der Stuten mit Flüssigkeit < 2 cm Durchmesser neutrophile Granulozyten nachweisbar. Aber auch hier wiesen die Stuten mit Flüssigkeit (n = 11) > 2 cm Durchmesser häufiger eine positive Zytologie auf (36 %, n = 4) als Stuten ohne und mit nur wenig intrauteriner Flüssigkeit (Tabelle 53). Der

Unterschied war jedoch im Fisher-Test nach dem Freeman-Halton-Prinzip statistisch nicht signifikant ($p = 0,13$).

Tabelle 53: Zytologische Untersuchung (ZU) der Endometriumszytologien in Bezug zu intrauterinen Flüssigkeitsansammlungen ($n = 157$), Entnahme mit Uteruskulturtupfer

	Keine Flüssigkeit	Flüssigkeit < 2 cm ø	Flüssigkeit > 2 cm ø	Summe
ZU negativ	117 (85 %)	6 (75 %)	7 (64 %)	130 (87 %)
ZU positiv	21 (15 %)	2 (25 %)	4 (36%)	27 (13 %)
Summe	138	8	11	157

4.5 Zusammenhang zwischen bakteriologischer und zytologischer Untersuchung

4.5.1 Verhältnis der zytologischen zu den bakteriologischen Befunden

Wie oft beim Nachweis einer Bakterienspezies eine Entzündung des Endometriums (> 0,5 % neutrophile Granulozyten in der Zytologie) festgestellt werden konnte, ist Tabelle 54 zu entnehmen. Die Ergebnisse sind für jedes der drei Entnahmesysteme separat dargestellt. Bei dieser Auswertung wurde nicht berücksichtigt, ob es sich um Nachweise in Reinkultur- oder Mischkultur handelte.

Tabelle 54: Beziehung zwischen zytologischem und bakteriologischem Ergebnis (E. = *Escherichia*, häm. = hämolysierend, Scc. = Streptokokken, sp. = Subspezies, + = Zytologie positiv, - = Zytologie negativ)

Bakterienspezies	Knudsen		Brush		UTP	
	+	-	+	-	+	-
β-hämolysierende Streptokokken	57 % 16	43 % 12	50 % 26	50 % 26	14 % 5	86 % 31
<i>Escherichia coli</i>	42 % 14	58 % 19	34 % 21	66 % 41	11 % 5	89 % 39

Ergebnisse

Bakterienspezies	Knudsen		Brush		UTP	
	+	-	+	-	+	-
Escherichia coli- hämolyzierend	0 % 0	100 % 1	100 % 1	0 % 0	100 % 1	0 % 0
Klebsiella spp.	50 % 4	50 % 4	43 % 3	57 % 4	0 % 0	100 % 7
Pseudomonas spp.	50 % 4	50 % 4	23 % 3	77 % 10	0 % 0	100 % 2
Staphylococcus aureus	100 % 1	0 % 0	100 % 1	0 % 0	0 % 0	100 % 1
Aerobe Bazillen	43 % 3	57 % 4	25 % 1	75 % 3	40 % 2	60 % 3
Coliforme Keime	33 % 3	67 % 6	37 % 3	63 % 5	7 % 1	93 % 14
α-hämolyzierende Streptokokken	45 % 9	55 % 11	31 % 8	69 % 18	10 % 2	90 % 19
γ-hämolyzierende Streptokokken	33 % 5	67 % 10	42 % 8	58 % 11	23 % 3	77 % 10
Enterokokken	0 % 0	100 % 1	50 % 2	50 % 2	0 % 0	100 % 3
Staphylococcus epidermidis	50 % 6	50 % 6	29 % 5	71 % 12	11 % 2	89 % 16
Unspezifisches Keimwachstum	60 % 6	40 % 4	50 % 7	50 % 7	25 % 3	75 % 9
Acinetobacter	25 % 3	75 % 9	53 % 10	47 % 9	18 % 2	82 % 9
Citrobacter	0 % 0	100 % 3	100 % 1	0 % 0	0 % 0	100 % 3
Corynebacterium	40 % 2	60 % 3	18 % 2	82 % 9	0 % 0	100 % 2
Micrococcus	- 0	- 0	- 0	- 0	0 % 0	100 % 1

Bakterienspezies	Knudsen		Brush		UTP	
	+	-	+	-	+	-
Alcaligenes	0 % 0	100 % 1	-	-	-	-
Hefen	-	-	0 % 0	100 % 1	-	-
β -hämol. Scc. + E. coli	49 % 23	51 % 24	40 % 34	60 % 51	10 % 6	90 % 56

Zusätzlich wurde überprüft, ob es bei einer Einteilung des Ergebnisses der bakteriologischen Untersuchung in negativ, Nachweis apathogener Keime und Nachweis fakultativ pathogener Keime signifikante Unterschiede hinsichtlich der zytologischen Ergebnisse gab. Im Person-Chi-Quadrat-Test konnte jedoch bei keinem der drei Entnahmesysteme ein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Tabellen 55 - 57).

Tabelle 55: Ergebnis der zytologischen Untersuchung (ZU) der exfoliativen Endometriumszytologien des Knudsen-Katheters (n = 120) in Bezug zum Ergebnis der bakteriologischen Untersuchung (BU)

	BU negativ	BU, apathogene Keime	BU, pathogene Keime	Summe
ZU negativ	18 (55 %)	22 (65 %)	26 (49 %)	66 (55 %)
ZU positiv	15 (45 %)	12 (35 %)	27 (51 %)	54 (45 %)
Summe	33	34	53	120

Der Unterschied war statistisch nicht signifikant ($p = 0,36$).

Ergebnisse

Tabelle 56: Ergebnis der zytologischen Untersuchung (ZU) der exfoliativen Endometriumszytologien des CytologyBrush® (n = 160) in Bezug zum Ergebnis der bakteriologischen Untersuchung (BU)

	BU negativ	BU, apathogene Keime	BU, pathogene Keime	Summe
ZU negativ	24 (80 %)	20 (57 %)	57 (60 %)	101 (63 %)
ZU positiv	6 (20 %)	15 (43 %)	38 (40 %)	59 (37 %)
Summe	30	35	95	160

Der Unterschied war statistisch nicht signifikant ($p = 0,09$).

Tabelle 57: Ergebnis der zytologischen Untersuchung (ZU) der exfoliativen Endometriumszytologien des Uteruskulturtupfers (n = 119) in Bezug zum Ergebnis der bakteriologischen Untersuchung (BU)

	BU negativ	BU, apathogene Keime	BU, pathogene Keime	Summe
ZU negativ	24 (92 %)	21 (78 %)	59 (89 %)	104 (87 %)
ZU positiv	2 (8 %)	6 (22 %)	7 (11 %)	15 (13 %)
Summe	26	27	66	119

Der Unterschied war statistisch nicht signifikant ($p = 0,21$).

4.5.2 Verhältnis des zytologischen zum bakteriologischem Befund bei den fakultativ pathogenen Keimen unter Berücksichtigung des Nachweises in Reinkultur oder Mischkultur (Entnahme der Zytologien mit dem CytologyBrush®)

β-hämolysierende Streptokokken

Beim Nachweis von β-hämolysierenden Streptokokken in Reinkultur waren in 70 % der Ausstriche (n = 7) neutrophile Granulozyten nachzuweisen. In Mischkultur mit anderen fakultativ pathogenen Keimen betrug der Anteil positiver Zytologie 47 % (n= 16), in Mischkultur mit apathogenen Keimen nur 37 % (n = 3) (Tabelle 58). Der Unterschied in der Anzahl positiver Zytologien beim Nachweis in Reinkultur oder in Mischkultur mit apathogenen und pathogenen Keimen war statistisch nicht signifikant ($p = 0,34$).

Tabelle 58: Ergebnis der exfoliativen Endometriumszytologien (ZU) beim Nachweis von β-hämolysierenden Streptokokken (n = 52) in der bakteriologischen Untersuchung (BU), Entnahme mit CytologyBrush®

	Reinkultur	Mischkultur mit fak. pathogenen Keimen	Mischkultur mit apathogenen Keimen
ZU positiv	7 (70 %)	16 (47 %)	3 (37 %)
ZU negativ	3 (30 %)	18 (53 %)	5 (63 %)
Summe	10	34	8

Escherichia coli

Beim Nachweis in Reinkultur wiesen die Ausstriche zu 37 % (n = 6) ein positives zytologisches Ergebnis auf. In Mischkultur mit anderen fakultativ pathogenen Keimen waren in 42 % der Proben (n =13), in Mischkultur mit apathogenen Keimen in 13 % (n = 2) der Proben neutrophile Granulozyten nachzuweisen (Tabelle 59). Der Unterschied in der Anzahl positiver Zytologien beim Nachweis in Reinkultur oder in

Ergebnisse

Mischkultur mit apathogenen und pathogenen Keimen war statistisch nicht signifikant ($p = 0,15$).

Tabelle 59: Ergebnis der exfoliativen Endometriumszytologien (ZU) beim Nachweis von *Escherichia coli* (n = 62) in der bakteriologischen Untersuchung (BU), Entnahme mit CytologyBrush®

	Reinkultur	Mischkultur mit fak. pathogenen Keimen	Mischkultur mit apathogenen Keimen
ZU positiv	6 (37 %)	13 (42 %)	2 (13 %)
ZU negativ	10 (63 %)	18 (58 %)	13 (87 %)
Summe	16	31	15

Klebsiella spp.

Klebsiella spp. in Reinkultur wurden nur einmal nachgewiesen, das zytologische Ergebnis war in dem Fall negativ. In Mischkultur mit anderen fakultativ pathogenen Keimen (n = 4) waren je zwei Ausstriche (50 %) zytologisch positiv und zwei Ausstriche negativ. In Mischkultur mit apathogenen Keimen waren ebenso in einer Probe (50 %) neutrophile Granulozyten nachzuweisen und in der anderen nicht (Tabelle 60).

Tabelle 60: Ergebnis der exfoliativen Endometriumszytologien (ZU) beim Nachweis von *Klebsiella spp.* (n = 7) in der bakteriologischen Untersuchung (BU), Entnahme mit CytologyBrush®

	Reinkultur	Mischkultur mit fak. pathogenen Keimen	Mischkultur mit apathogenen Keimen
ZU positiv	0 (0 %)	2 (50 %)	1 (50 %)
ZU negativ	1 (100 %)	2 (50 %)	1 (50 %)
Summe	1	4	2

Pseudomonas spp.

Der Nachweis in Reinkultur gelang nur in einem Fall, das zytologische Ergebnis war negativ. In Mischkultur mit apathogenen (n = 4) und pathogenen Keimen (n = 8) betrug der Anteil zytologisch negativer Proben jeweils 75 % (n = 3) (Tabelle 61).

Tabelle 61: Ergebnis der exfoliativen Endometriumszytologien (ZU) beim Nachweis von *Pseudomonas spp.* (n = 13) in der bakteriologischen Untersuchung (BU), Entnahme mit CytologyBrush®

	Reinkultur	Mischkultur mit fak. pathogenen Keimen	Mischkultur mit apathogenen Keimen
ZU positiv	0 (0 %)	2 (25 %)	1 (25 %)
ZU negativ	1 (100 %)	6 (75 %)	3 (75 %)
Summe	1	8	4

Escherichia coli-hämolyzierend

Hämolyzierende *Escherichia coli* konnten nur einmal, und zwar in Mischkultur mit apathogenen Erregern nachgewiesen werden. Das zytologische Ergebnis war in dem Fall positiv.

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus konnte nur einmal in Mischkultur mit apathogenen Keimen nachgewiesen werden, das zytologische Ergebnis war positiv.

Ergebnisse

4.5.3 Vergleich des Anteils zytologisch positiver Proben zwischen den verschiedenen Keimarten

Der Vergleich, ob der Anteil an positiven Zytologien in Proben, in denen in der bakteriologischen Untersuchung ein bestimmter Keim nachgewiesen werden konnte, höher war als in Proben, in denen in der bakteriologischen Untersuchung dieser Keim nicht nachgewiesen werden konnte, erfolgte mit dem Pearson-Chi-Quadrat-Test oder dem zweiseitigem exakten Test nach Fisher.

Bei β -hämolisierenden Streptokokken konnte ein statistisch signifikant höherer Anteil an Ausstrichen mit einem Gehalt an neutrophilen Granulozyten über 0,5 % festgestellt werden ($p = 0,02$) gegenüber Proben, in denen keine β -hämolisierenden Streptokokken nachgewiesen werden konnten. Dies galt allerdings nur bei der Entnahme der Zytologien mit dem CytologyBrush®. Bei Verwendung der anderen Entnahmesysteme war der Unterschied nicht signifikant (Tabelle 62).

Tabelle 62: Vergleich des Anteils zytologisch positiver Proben zwischen den einzelnen Keimarten bei den einzelnen Entnahmesystemen (E. = *Escherichia*, häm. = hämolysierend, Scc. = Streptokokken, Staph. = *Staphylococcus*)

Bakterienspezies		β -häm. Scc.	E. coli	E. coli- häm.	Klebsiella spp.
p- Wert	Knudsen	0,14	0,73	1,00	1,00
	Brush	0,02	0,53	0,37	0,71
	UTP	0,78	0,75	0,13	0,60

Bakterienspezies		Pseudo- monas spp.	Staph. aureus	Aerobe Bazillen	Coliforme Keime
p- Wert	Knudsen	1,00	0,45	1,00	0,51
	Brush	0,28	0,37	1,00	0,97
	UTP	1,00	1,00	0,12	0,46

Bakterienspezies		α -häm. Scc.	γ -häm. Scc.	Enterokokken	Staph. epidermidis
p- Wert	Knudsen	1,00	0,33	1,00	0,71
	Brush	0,48	0,61	0,63	0,50
	UTP	1,00	0,21	1,00	0,84

Bakterienspezies		Unspezif. Keime	Acineto- bacter	Citrobacter	Micrococcus spp.
p- Wert	Knudsen	0,32	0,14	0,25	-
	Brush	0,29	0,13	0,37	-
	UTP	0,17	0,56	1,00	1,00

Bakterienspezies		Alcaligenes	Hefen	β -häm. Scc. + E. coli
p- Wert	Knudsen	1,00	-	0,49
	Brush	-	1,00	0,38
	UTP	-	-	0,32

4.5.4 Zusammenhang zwischen dem Neutrophilen-Index in den exfoliativen Endometriumszytologien und der Stärke des Keimgehaltes in der bakteriologischen Untersuchung

Der Zusammenhang, ob ein erhöhter Keimgehalt auch zu einer höheren Anzahl an neutrophilen Granulozyten im Ausstrich führt, wurde mit dem Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman geprüft (Tabelle 63).

Ein statistisch signifikanter Einfluss ($r_s = 0,20$; $p = 0,01$) des Keimgehaltes auf die Anzahl an neutrophilen Granulozyten im zytologischen Ausstrich konnte von β -hämolyisierenden Streptokokken ($n = 52$), bei der Entnahme der Zytologien mit dem CytologyBrush[®], nachgewiesen werden. Bei steigendem Keimgehalt nahm die Anzahl an neutrophilen Granulozyten zu. Eine Korrelation ($r_s = 0,26$; $p = 0,005$) konnte ebenfalls bei dem Nachweis von hämolysierenden *Escherichia coli* ($n = 1$,

Ergebnisse

Entnahme der Zytologie mit Uteruskulturtupfer) festgestellt werden. Bei Mikrokokken ($n = 1$; $r_s = -0,12$; $p = 0,03$) und Corynebakterien ($n = 2$; $r_s = -0,18$; $p = 0,04$) lag auch ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Keimgehalt und dem Nachweis von Entzündungszellen im Uteruskulturtupfer vor. Bei steigendem Keimgehalt nahm die Anzahl an neutrophilen Granulozyten ab. Bei den letzten drei genannten Bakterienspezies ist der sehr geringe Stichprobenumfang zu beachten.

Tabelle 63: Zusammenhang zwischen dem Neutrophilen-Index in den exfoliativen Endometriumszytologien von Stuten und der Stärke des Keimgehaltes in der bakteriologischen Untersuchung (r_s = Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman, p = p-Wert)

Bakterienspezies	β -häm. Scc.	E. coli	E. coli- häm.	Klebsiella spp.
Knudsen (r_s / p)	0,12 / 0,20	-0,03 / 0,70	-0,08 / 0,39	0,07 / 0,44
Brush (r_s / p)	0,20 / 0,01	0,03 / 0,70	0,14 / 0,07	0,04 / 0,66
UTP (r_s / p)	0,10 / 0,28	-0,02 / 0,85	0,26 / 0,005	-0,10 / 0,29

Bakterienspezies	Pseudo- monas spp.	Staph. aureus	Aerobe Bazillen	Coliforme Keime
Knudsen (r_s / p)	0,05 / 0,57	0,09 / 0,34	-0,04 / 0,66	-0,10 / 0,30
Brush (r_s / p)	-0,08 / 0,39	0,08 / 0,34	-0,04 / 0,66	-0,03 / 0,70
UTP (r_s / p)	-0,05 / 0,58	-0,04 / 0,66	0,15 / 0,10	-0,08 / 0,39

Bakterienspezies	α -häm. Scc.	γ -häm. Scc.	Enterokokken	Staph. epidermidis
Knudsen (r_s / p)	-0,04 / 0,66	-0,07 / 0,44	-0,08 / 0,39	0,01 / 0,88
Brush (r_s / p)	-0,11 / 0,18	0,07 / 0,35	0,05 / 0,55	-0,04 / 0,66
UTP (r_s / p)	-0,66 / 0,53	0,15 / 0,09	-0,06 / 0,50	-0,05 / 0,60

Bakterienspezies	Unspezif. Keime	Acineto-bacter	Citrobacter	Micrococcus spp.
Knudsen (r_s / p)	0,11 / 0,17	-0,11 / 0,25	-0,14 / 0,13	-
Brush (r_s / p)	0,09 / 0,25	0,11 / 0,17	0,13 / 0,10	-
UTP (r_s / p)	0,12 / 0,19	0,04 / 0,66	-0,06 / 0,50	- 0,12 / 0,03

Bakterienspezies	Alcaligenes	Hefen	β -häm. Scc. + E. coli
Knudsen (r_s / p)	-0,17 / 0,06	-	0,04 / 0,66
Brush (r_s / p)	-	-0,07 / 0,44	0,11 / 0,17
UTP (r_s / p)	-	-	0,01 / 0,91

4.6 Einflussfaktoren auf das Trächtigkeitsergebnis

Insgesamt wurde von 253 Stuten das Trächtigkeitsergebnis erfasst. Die Trächtigkeitsrate lag bei 48 % ($n = 122$).

Anamnese

Die höchste Trächtigkeitsrate wiesen mit 63 % ($n = 24$) Stuten auf, die ein Fohlen bei Fuß führten. Bei Maidenstuten betrug sie 54 % ($n = 38$), ebenso bei Stuten ($n = 21$), die bereits ein lebendes Fohlen zur Welt gebracht hatten, jedoch ein oder mehrere Jahre nicht mehr besamt worden waren. Bei in der letzten Zuchsaison güt gebliebenen Stuten konnte nur in 39 % der Fälle ($n = 33$) eine Trächtigkeit nachgewiesen werden. Noch geringer war die Rate mit 35 % ($n = 11$) bei Stuten mit Störungen wie Fruchtresorption oder Abort in der letzten Trächtigkeit (Tabelle 64).

Ergebnisse

Tabelle 64: Ergebnis der Trächtigkeitsuntersuchung (TU), Einteilung der Stuten nach der Anamnese

	Fohlen- stuten	Maiden- stuten	Güste Stuten	Stuten mit Trächtigkeits- störungen	Nicht besamte Stuten	Summe
TU positiv	24 (63 %)	33 (54 %)	33 (39 %)	11 (35 %)	21 (54 %)	122 (48 %)
TU negativ	14 (37 %)	28 (46 %)	51 (61 %)	20 (65 %)	18 (46 %)	131 (52 %)
Summe	38	61	84	31	39	253

Gynäkologische Untersuchung

Die Trächtigkeitsrate bei Stuten mit intrauterinen Zysten (n = 16) betrug 38 % (n = 6). Bei zwei Stuten konnte zusätzlich intrauterine Flüssigkeit < 2 cm Durchmesser nachgewiesen werden, davon konnte eine Stute erfolgreich besamt werden. Beide Stuten, bei denen neben Zysten Flüssigkeitsansammlungen > 2 cm Durchmesser festgestellt wurde, waren nicht tragend.

Waren keine Zysten, aber Flüssigkeitsansammlungen < 2 cm Durchmesser vorhanden (n = 14), betrug die Trächtigkeitsrate 21 % (n = 3). Von 11 Stuten mit Flüssigkeitsansammlungen über 2 cm Durchmesser waren nur 18 % (n = 2) tragend.

Der Anteil an tragenden Stuten war bei Stuten ohne auffälligen Befund in der gynäkologischen Untersuchung (n = 216) mit 51 % (n = 110) deutlich höher (Tabelle 65).

Tabelle 65: Ergebnis der Trächtigkeitsuntersuchung (TU), Einteilung der Stuten nach dem Befund in der gynäkologischen Untersuchung (o. b. B. = ohne besonderen Befund)

	Zysten	Zysten + Flüssigkeit < 2 cm	Zysten + Flüssigkeit > 2 cm	Flüssigkeit < 2 cm	Flüssigkeit > 2 cm	o.b.B.
TU positiv	6 (38 %)	1 (50 %)	0 (0 %)	3 (21 %)	2 (18 %)	110 (51 %)
TU negativ	10 (62 %)	1 (50 %)	2 (100 %)	11 (79 %)	9 (82 %)	106 (49 %)
Summe	16	2	2	14	11	216

Exfoliative Endometriumszytologien

Knudsen-Katheter

Stuten mit einem positiven zytologischen Befund wiesen zu 51 % (n = 21) ein positives Trächtigkeitsergebnis auf, Stuten mit negativem zytologischen Ergebnis zu 49 % (n = 32) (Tabelle 66).

Tabelle 66: Ergebnis der Trächtigkeitsuntersuchung (TU) in Bezug zum zytologischen Ergebnis (ZU) im Knudsen-Katheter

	ZU positiv	ZU negativ	Summe
TU positiv	21 (51 %)	32 (49 %)	53
TU negativ	20 (49 %)	33 (51 %)	53
Summe	41	65	106

Ergebnisse

CytologyBrush®

Die Trächtigkeitsrate von Stuten, bei denen ein Prozent-Befund von über 0,5 % neutrophile Granulozyten festgestellt wurde (n = 37), betrug 54 % (n = 20), bei Stuten ohne zytologische Entzündungsanzeichen (n = 114) 46 % (Tabelle 66).

Tabelle 66: Ergebnis der Trächtigkeitsuntersuchung (TU) in Bezug zum zytologischen Ergebnis (ZU) im CytologyBrush®

	ZU positiv	ZU negativ	Summe
TU positiv	20 (54 %)	53 (46 %)	73
TU negativ	17 (46 %)	61 (54 %)	78
Summe	37	114	151

Uteruskulturtupfer

Auch hier lag die Trächtigkeitsrate bei Stuten mit positivem Entzündungszellnachweis höher (60 % / n = 6) als bei denjenigen Stuten, bei denen keine Entzündungszellen in der Zytologie nachgewiesen werden konnten (48 % / n = 47) (Tabelle 67).

Tabelle 67: Ergebnis der Trächtigkeitsuntersuchung (TU) in Bezug zum zytologischen Ergebnis (ZU) im Uteruskulturtupfer

	ZU positiv	ZU negativ	Summe
TU positiv	6 (60 %)	47 (48 %)	53
TU negativ	4 (40 %)	50 (52 %)	54
Summe	10	97	107

Ergebnis der bakteriologischen Untersuchung

Die Trächtigkeitsraten bei Stuten, bei denen in der bakteriologischen Untersuchung keine (n = 62), fakultativ pathogene (n = 100) oder nur apathogene Keime (n = 56) nachgewiesen wurden, waren mit 44 %, 48 % und 43 % nahezu identisch (Tabelle 67).

Tabelle 67: Ergebnis der Trächtigkeitsuntersuchung (TU) in Bezug zum bakteriologischen Ergebnis (BU) (fak. = fakultativ)

	BU-negativ	BU-fak. pathogene Keime	BU-fak. apathogene Keime
TU positiv	27 (44 %)	48 (48 %)	24 (43 %)
TU negativ	35 (56 %)	52 (52 %)	32 (57 %)
Summe	62	100	56

Die Verteilung bei den einzelnen Keimarten ist Tabelle 68 zu entnehmen.

Tabelle 68: Ergebnis der Trächtigkeitsuntersuchung (TU) beim Nachweis der einzelnen Keimarten (path. = fakultativ pathogene Keime; apath = fakultativ apathogene Keime; sp. = Subspezies)

Keimart	Kultivierung	TU positiv	TU negativ
β-hämolysierende Streptokokken	Reinkultur	4 (44 %)	5 (56 %)
	Mischkultur- path	13 (43 %)	17 (57 %)
	Mischkultur- apath	8 (44 %)	10 (56 %)
Escherichia coli	Reinkultur	6 (43 %)	8 (57 %)
	Mischkultur- path	16 (47 %)	18 (53 %)
	Mischkultur- apath	14 (52 %)	13 (48 %)

Ergebnisse

Keimart	Kultivierung	TU positiv	TU negativ
Pseudomonas spp.	Reinkultur	1 (100 %)	-
	Mischkultur- path	2 (22 %)	7 (78 %)
	Mischkultur- apath	1 (33 %)	2 (67 %)
Klebsiella spp.	Reinkultur	-	1 (100 %)
	Mischkultur- path	1 (17 %)	5 (83 %)
	Mischkultur- apath	-	1 (100 %)
Escherichia coli- hämolsierend	Reinkultur	-	-
	Mischkultur- path	1 (100 %)	-
	Mischkultur- apath	-	-
α- hämolsierende Streptokokken	Reinkultur	2 (50 %)	2 (50 %)
	Mischkultur- path	16 (55 %)	13 (45 %)
	Mischkultur- apath	5 (83 %)	1 (17 %)
γ- hämolsierende Streptokokken	Reinkultur	1 (33 %)	2 (67 %)
	Mischkultur- path	9 (53 %)	8 (47 %)
	Mischkultur- apath	4 (57 %)	3 (43 %)
Staphylococcus epidermidis	Reinkultur	1 (14 %)	6 (86 %)
	Mischkultur- path	2 (15 %)	11 (85 %)
	Mischkultur- apath	5 (83 %)	1 (17 %)

Der potentielle Zusammenhang zwischen den Daten aus der Anamnese, der gynäkologischen und bakteriologischen Untersuchung sowie dem Nachweis von neutrophilen Granulozyten in der exfoliativen Endometriumszytologie zur Trächtigkeitrate wurde mittels einer schrittweisen multiplen logistischen Regression geprüft.

Dabei erwies sich der Zusammenhang zwischen intrauterinen Flüssigkeitsansammlungen und dem Trächtigkeitsergebnis als signifikant ($p = 0,01$). Der Zusammenhang zur Anamnese war knapp nicht signifikant ($p = 0,051$). Alle anderen Kriterien erbrachten kein signifikantes Ergebnis (Tabelle 69).

Tabelle 69: Zusammenhang zwischen Daten aus Anamnese, gynäkologischer und bakteriologischer Untersuchung sowie dem Nachweis von neutrophilen Granulozyten (ProzPMN) in der exfoliativen Endometriumszytologie zur Trächtigkeitsrate.

Parameter	p-Wert
ProzPMN mit Knudsen-Katheter	0,25
ProzPMN mit CytologyBrush®	0,71
ProzPMN mit Uteruskulturtupfer	0,29
Erythrozyten mit Knudsen-Katheter	0,63
Erythrozyten mit CytologyBrush®	0,64
Erythrozyten mit Uteruskulturtupfer	0,17
Maximum- pathogene Keime	0,55
Summe- pathogene Keime	0,83
Gleichzeitiger Nachweis von β -Streptokokken und Escherichia coli	0,42
Alter der Stuten	0,84
Anamnese	0,051
Intrauterine Zysten	0,38
Intrauterine Flüssigkeitsansammlung vor der Besamung	0,01

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Fragestellung

Endometritiden gelten als quantitativ wichtigste Erkrankung des Genitaltraktes bei der Stute (Troedsson, 1997; Liu und Troedsson, 2008). Ihrer Diagnostik wird eine große Bedeutung bei der Erforschung und Therapie von Fruchtbarkeitsstörungen beigemessen (Riddle et al., 2007). Im Rahmen der gynäkologischen Untersuchung von Zuchtstuten spielt deshalb die intrauterine Probenentnahme zur Detektion von uterinen Infektionen eine große Rolle (Causey, 2007; Walter und Wehrend, 2007).

Das hierbei gewonnene Material sollte sowohl für eine mikrobiologische als auch für eine zytologische Untersuchung zum Nachweis von endometrialen Entzündungsreaktionen genutzt werden (Wingfield Digby, 1978; Brook, 1985; Bourke et al., 1997; Aguilar et al., 2005; Liu und Troedsson, 2008). Ein großer Vorteil der Zytologie gegenüber einer alleinigen mikrobiologischen Untersuchung liegt in der schnellen Verfügbarkeit der Ergebnisse (Knudsen, 1964; Wingfield Digby, 1978; Brook, 1992; Møller Nielsen, 2005).

Auf dem Markt befinden sich zahlreiche Systeme zur Entnahme von Endometriumszytologien (Knudsen-Katheter, Baumwolltupfer, Kalayjian culture instrument[®], CytologyBrush[®] sowie verschiedene Uterus-Lavage-Techniken). Bisher liegen nur wenige Untersuchungen zum Vergleich der Systeme untereinander beim Pferd vor (Ball et al., 1988; Bourke et al., 1997; Dascanio et al., 1997; Aguilar et al., 2005). Ein standardisiertes Entnahmeverfahren existiert nicht (Card, 2005).

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es diese Informationslücke zu füllen, um für den Einsatz in der Forschung und der tierärztlichen Patientenversorgung das geeignetste System auszuwählen.

5.2 Diskussion der Methodik

Die Untersuchungen wurden an einem heterogenen Patientenmaterial durchgeführt und nicht an definierten Versuchstieren, um Ergebnisse zu erzielen, die für Stuten repräsentativ sind, die unter Feldbedingungen an einer Endometritis erkrankt sind oder nicht.

Es wurden von 233 Stuten insgesamt 340 Proben entnommen, bei denen in 279 Fällen zusätzlich zu den zytologischen auch mikrobiologische Untersuchungen durchgeführt wurden. Dabei galt jede Probenentnahme (Zytologie oder Zytologie in Kombination mit mikrobiologischer Untersuchung) als eigenständiges Ereignis. Der Einfluss von einzelnen Stuten, die mehrmals beprobt und damit in die Studie einfließen, auf das Ergebnis wurde dabei nicht berücksichtigt. Diese Methodik entspricht der Vorgehensweise anderer Autoren (Riddle et al., 2007).

Bei der Interpretation der Ergebnisse, insbesondere in Hinblick auf die Trächtigkeitsrate, sollte beachtet werden, dass zu einem hohen Prozentsatz (49 %) Stuten mit Fruchtbarkeitsproblemen in die Studie aufgenommen wurden. Dies ergab sich aus den Einschlusskriterien für die bakteriologische Untersuchung (siehe 3.2.1).

Nach der Auswertung der bakteriologischen Ergebnisse hinsichtlich der Häufigkeiten der nachgewiesenen Keimarten zeigte sich, dass die Resultate mit den Angaben in der Literatur übereinstimmen (Ricketts und Mackintosh, 1987; Albiñ et al., 2003; Ghasemzadeh-nava et al., 2004; Møller Nielsen, 2005; Riddle et al., 2007; Frontoso et al., 2008; Wittenbrink et al., 2008). Auch das Durchschnittsalter der Stuten von 11,8 Jahren entspricht nahezu dem (11,9 Jahre) in einer umfangreichen retrospektiven Studie über bakteriologische Untersuchungen bei Stuten von Frontoso et al. (2008). Diese Faktoren sprechen dafür, dass das untersuchte Kollektiv repräsentativ ist.

Eine ausführliche allgemeine Untersuchung wurde nur bei denjenigen Stuten durchgeführt, bei denen sich im Rahmen der Adspektion und/ oder gynäkologischen Untersuchung Hinweise auf eine Störung des Allgemeinbefindens ergaben. Auffälligkeiten wie Verletzungen, Nasenausfluss und Abweichungen in Pflege- und Ernährungszustand wurden dokumentiert und gegebenenfalls weitergehende diagnostische Maßnahmen vorgenommen, die in Einzelfällen zu einem Ausschluss aus der Untersuchung führten.

Intrauterine Probenentnahme

Die Endometriumszytologie ist ein wertvolles und leicht durchzuführendes Verfahren in der gynäkologischen Untersuchung von Zuchtstuten, welches sich in der Praxis in

Diskussion

Deutschland jedoch noch nicht durchgesetzt hat (Walter und Wehrend, 2007). Einer der Gründe ist der Mangel eines Entnahmesystemes, mit dem auch unter Praxisbedingungen eine adäquate intrauterine Probengewinnung möglich ist.

Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, ein solches System zur Entnahme von Endometriumszytologien bei Pferden für den routinemäßigen Gebrauch zu etablieren. Von einem Vergleich der hier verwendeten Systeme mit einer der verschiedenen Uterus-Lavage-Techniken, die bei subfertilen Stuten gute Ergebnisse bringen (Slusher et al., 1984; Ball et al., 1988; LeBlanc et al., 2007), wurde aufgrund des hohen Zeit- und Materialaufwandes, der den Einsatz in der Praxis einschränkt, abgesehen.

Es ist bekannt, dass die Ergebnisse von intrauterinen bakteriologischen und zytologischen Proben bei der Entnahme mittels unbedeckter Systeme keinesfalls den Zustand in utero widerspiegeln (Shin et al., 1979; Blanchard et al., 1981b; Wingfield Digby und Ricketts, 1982; Aguilar et al., 2005; Klein et al., 2009). Um solche Kontaminationen mit Bakterien und neutrophilen Granulozyten aus Vagina und Zervix zu vermeiden, handelte es sich bei den in dieser Studie angewandten Systemen zur Probenentnahme ausnahmslos um bedeckte Entnahmesysteme.

Die Systeme wurden unter Handschutz eingeführt, auf die Nutzung eines Polanski-Spekulums wurde verzichtet. Dieses bringt zwar den Vorteil einer zusätzlichen Beurteilungsmöglichkeit von Vagina, Hymenalringschluß und Zervix, allerdings wird die Entnahme unter digitaler Kontrolle von den Stuten oftmals besser toleriert (Walter, 2009) und von den meisten Autoren bei Verwendung von doppelt geschützten Entnahmesystemen für ausreichend erachtet (Wingfield Digby, 1978; Wingfield Digby und Ricketts, 1982; Couto und Hughes, 1984; LaCour und Sprinkle, 1985; Brook, 1992; Møller Nielsen, 2005).

Zytologische Untersuchung

In der Literatur gibt es zahlreiche Angaben zur Durchführung und Interpretation exfoliativer Endometriumszytologien bei Zuchtstuten (Knudsen, 1964; Peterson et al., 1969; Pohl et al., 1977; Tillmann und Lauer, 1977; Wingfield Digby, 1978; Wingfield Digby und Ricketts, 1982; Knudsen, 1982; Tillmann und Meinecke, 1982; Couto und

Hughes, 1984; Mattos et al., 1984; Slusher et al., 1984; Brook, 1985; Crickman und Pough, 1986; Freeman et al., 1986; Roszel und Freeman, 1988; Schmidt, 1988; Waelchi et al., 1988; Brook, 1992; Bourke et al., 1997; Dascanio et al., 1997; Baranski et al., 2003; Dascanio, 2003; Card et al., 2004; Card, 2005; Aguilar et al., 2005; Walter et al., 2006; LeBlanc et al., 2007; Riddle et al., 2007; Walter und Wehrend, 2007).

Die Wahl der Entnahmesysteme ergab sich aus der Fragestellung dieser Arbeit. Bei dem Uteruskulturtupfer handelte es sich um einen kommerziell erhältlichen Baumwolltupfer. Solche Einmaltupfer werden häufig für diese Indikation verwendet (Brook, 1985, LaCour und Sprinkle, 1985, Crickman und Pough, 1986) und für die einfache und schnelle Kontrolle auf das Vorhandensein von neutrophilen Granulozyten als ausreichend angesehen (Brook, 1992).

Der Knudsen-Katheter wird traditionell in der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz der Universität Gießen als System zur zeitgleichen Gewinnung von Material für die bakteriologische und zytologische Untersuchung genutzt und wurde aufgrund der positiven Erfahrungen (Wehrend et al., 2006) in die Studie einbezogen. Vergleichende Studien mit anderen Systemen existieren nicht. Der Knudsen-Katheter ist in der Praxis kaum verbreitet. Das Hauptproblem dürfte dabei in Länge des Gerätes von 60 cm liegen, die es schwierig macht, den Katheter in den üblichen Autoklaven zu sterilisieren.

Zytologie-Bürstchen haben sich bereits in der Rinderpraxis etabliert (Kasimanickam et al., 2004, 2005; Raab, 2004) und gelten als die zuverlässigste Methode zur Endometritis-Diagnostik bei dieser Tierart (Barlund et al., 2008). Ein Vergleich mit anderen Entnahmesystemen zur Gewinnung von exfoliativen Endometriumszytologien beim Pferd mit diesem System wurde bisher nur von Bourke et al. (1997) durchgeführt. Lediglich vereinzelt finden sich Berichte über Entnahmen mit modifizierten Abstrichbürstchen aus der Humanmedizin auf dem Gebiet der Reproduktionsmedizin bei der Stute (Langoni et al., 1997; Pansegrau, 2007). Allerdings berichten Liu und Troedsson (2008) über persönliche, nicht veröffentlichte Erfahrungen von Tierärzten, die Cytobrushes bei Stuten zur Gewinnung von endometrialen Ausstrichen nutzten und diese Methode für sehr vielversprechend halten. Um diese Informationslücke zu füllen, wurde der

Diskussion

CytologyBrush[®], der seit dem Jahr 2008 auch in Deutschland im Handel erhältlich ist, in die Studie aufgenommen.

Die Methodik der Zellentnahme und Probenaufbereitung konnte aus der Literatur übernommen werden. Als Färbung wurde die Eosin-Thiazin-Methode gewählt. Sie ist schnell durchführbar, erlaubt eine gute Differenzierung zwischen neutrophilen Granulozyten und Endometriumszellen und wird in der Praxis häufig eingesetzt (Couto und Hughes, 1984; Brook, 1992; Walter et al., 2006).

Eine Entzündung des Endometriums wird durch die Präsenz von Entzündungszellen, insbesondere von neutrophilen Granulozyten, diagnostiziert. Für die Interpretation finden sich in der Literatur zahlreiche Beurteilungsmöglichkeiten, die allerdings zum Teil sehr stark differieren, eine allgemein anerkannte Methode existiert nicht (Card, 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bewertung nach Ricketts und Mackintosh (1987) durchgeführt, die auf einem Score des prozentualen Anteils der neutrophilen Granulozyten an den Endometriumszellen basiert. Dies bietet gegenüber einer alleinigen Auszählung der neutrophilen Granulozyten pro Gesichtsfeld des Ausstriches den Vorteil, dass das Verhältnis zwischen der Anzahl an Endometriumszellen und neutrophilen Granulozyten besser berücksichtigt wird. Dabei gilt ein Ausstrich mit über 0,5 % Entzündungszellen als zytologisch positiv. Diese Grenze ist im Vergleich zu anderen Autoren (Couto und Hughes, 1984; Ball et al., 1988; Card, 2005) niedrig. Da aber von großem Interesse war, welches der drei Systeme sensitiver neutrophile Granulozyten nachweist, wurde bewusst diese niedrige Schwelle gewählt.

Statistische Auswertung

Beim Vergleich des bakteriologischen mit dem zytologischen Ergebnis trat das Problem auf, dass in den Proben oftmals eine Mischbesiedlung mit mehreren Keimen nachgewiesen wurde. In solchen Fällen war es deshalb nicht ohne weiteres möglich, einen klaren Bezug zwischen dem zytologischen Ergebnis und nur einer Keimart herzustellen. Zur Auswertung musste deshalb differenziert werden, ob eine Bakterienspezies in Reinkultur oder Mischkultur vorlag.

Dieses Problem war aus dem Literaturstudium kaum ersichtlich oder wurde von den meisten Autoren nicht berücksichtigt. Konsequenterweise wurde dieser Aspekt nur von Wingfield Digby und Ricketts (1982) einbezogen, die bei dem Vergleich des zytologischen Befundes mit der jeweiligen Keimart eine Unterteilung dahingehend vornahm, ob der Keim in Reinkultur oder Mischkultur nachgewiesen wurde. Bei Riddle et al. (2007) werden nur einzelne Keimarten in Kombination mit dem zytologischen Befund aufgeführt. Mischbesiedlungen mit über zwei nachgewiesenen Organismen werden separat gewertet, so dass davon auszugehen ist, dass es sich bei den anderen Fällen um Nachweise in Reinkultur handelt. Allerdings erscheint die Anzahl von nur 21 Fällen mit über zwei Organismen bei insgesamt 231 Proben mit positivem Keimnachweis äußerst gering. Andere Autoren nehmen keine Keimdifferenzierung vor, sondern werten jegliches Keimwachstum als bakteriologisch positives Ergebnis (Knudsen, 1964; Wingfield Digby, 1978; Brook, 1992), oder es wird eine Unterteilung der Keime in fakultativ pathogen oder apathogen vorgenommen, jedoch nicht näher erläutert, ob es sich um Nachweise in Reinkultur oder Mischkultur handelt (Pohl et al., 1977; Mattos et al., 1984).

Weiterhin kam bei der Fragestellung, ob es einen Zusammenhang zwischen dem bakteriologischen und dem zytologischen Ergebnis gibt, hinzu, dass die Zytologien in dieser Studie mit drei unterschiedlichen Systemen entnommen wurden und somit die Vergleiche nur für jedes System separat durchgeführt werden konnten, was die Fallzahlen reduzierte.

Um die Ergebnisse dennoch korrekt darzustellen, wurden zwei unterschiedliche Auswertungen vorgenommen. In der ersten Auswertung wurde nur der Anteil zytologisch positiver Proben bei den einzelnen Keimarten in allen drei Systemen miteinander verglichen, ohne zu unterscheiden, ob es sich um eine Rein- oder Mischkultur handelte. In einer zweiten Auswertung erfolgte eine Aufschlüsselung der fakultativ pathogenen Keime hinsichtlich des Vorliegens in Reinkultur, in Mischkultur mit anderen fakultativ pathogenen Keimen und in Mischkultur mit apathogenen Erregern. Ein Vergleich mit dieser Unterteilung der Keime wurde nur für das zytologische Ergebnis bei der Entnahme der Zytologie mit dem CytologyBrush® durchgeführt. Dies lag darin begründet, dass von diesem System die höchste Anzahl an auswertbaren Proben vorlag und neutrophile Granulozyten sicher nachgewiesen werden konnten (siehe 4.3.2).

Diskussion

In der logistischen Regression zur Trächtigkeitsanalyse wurde von den 20 verschiedenen Keimarten nur der Einfluss der fakultativ pathogenen Keime auf die Trächtigkeitsrate untersucht, da bei Berücksichtigung aller Keimarten zuwenig Fälle für eine aussagekräftige Auswertung übrig geblieben wären.

5.3 Bakteriologische Untersuchung

Der am häufigsten isolierte Keim war mit einem Anteil von 33 % *Escherichia coli*. In 20 % der Proben gelang der Nachweis in Reinkultur. In 50 % der Fälle ließen sich noch weitere fakultativ pathogene Keime, zumeist β -hämolyisierende Streptokokken, oder apathogene Keime (30 %) nachweisen. Dies bestätigt Ergebnisse von LeBlanc et al. (2007), die bei subfertilen Stuten ebenfalls am häufigsten (42 %) *Escherichia coli* fanden. Hier lag der Anteil der Nachweise in Reinkultur allerdings bei 65 %. Die übrigen 35 % lagen in Mischkultur vor, überwiegend mit β -hämolyisierenden Streptokokken. Dies gilt ebenso für die Untersuchungen von Frontoso et al. (2008). Ein ähnlich hoher Anteil an Nachweisen in Reinkultur (67 %) zeigte sich bei Albihn et al. (2003). Hier betrug der Anteil an Proben mit Wachstum von *Escherichia coli* bei subfertilen Stuten insgesamt sogar 67 %.

Manche Autoren werten den Nachweis von Mischkulturen, insbesondere mit *Escherichia coli*, als Kontamination und schließen diese zum Teil von ihren Untersuchungen aus (Ricketts, 1981; Møller Nielsen, 2005). Da die Proben in dieser Arbeit mittels bedeckter Tupfersysteme unter sauberen Bedingungen gewonnen wurden, ist nicht davon auszugehen, dass der hohe Anteil an Mischkulturen auf Kontaminationen im Rahmen der Entnahme und Verarbeitung zurückzuführen ist. Die Problematik der Interpretation von Mischkulturen ist bekannt (Wingfield Digby und Ricketts, 1982; Merkt et al., 1987; Albihn et al., 2003). In einer Studie von Ricketts und Mackintosh (1987) konnten in 40 % der Proben sowohl aerobe als auch anaerobe Keime nachgewiesen werden. Mittlerweile wird ein Wachstum von Mischkulturen durchaus als relevant angesehen (Albihn et al., 2003; LeBlanc et al., 2007; Wittenbrink et al., 2008). Bestätigt wird diese Einschätzung durch Ergebnisse von Riddle et al. (2007), die in allen Proben, in denen mehr als zwei Keimarten detektiert wurden, einen als krankhaft einzustufenden Gehalt an neutrophilen

Granulozyten in den exfoliativen Endometriumszytologien nachweisen konnten, was für einen entzündlich veränderten Uterus spricht.

Auffällig war die hohe Anzahl an *Escherichia coli*-Nachweisen, in denen neben *Escherichia coli* auch β -hämolyisierende Streptokokken nachgewiesen wurden (41 %). Gründe hierfür könnten in den antiphagozytotischen Eigenschaften von β -hämolyisierenden Streptokokken wie Antigen-Variation (Walker und Timoney, 1998), M-like Protein (Timoney und Mukhtar, 1993), Hyaluronsäurekapsel (Wibiwan et al., 1999) und Fc-Rezeptoren (Jonsson et al., 1995) liegen, welche die Komplementkaskade unterbrechen und somit die Kolonisation von gramnegativen Bakterien wie *Escherichia coli* begünstigen (Lyle et al., 1991).

Wie bei Pohl et al. (1977), Albiñ et al. (2003) und Frontoso et al. (2008) wurden hämolyisierende *Escherichia coli*-Isolate äußerst selten (0,7 %) nachgewiesen, so dass es als unwahrscheinlich anzusehen ist, dass nur hämolyisierende Isolate (Chen et al., 2003; Wittenbrink et al., 2008) bei uterinen Infektionen von Relevanz sind. Dieser Ansicht widersprechen zudem Untersuchungen von Albiñ et al. (2003), Ghasemzadeh-nava et al. (2004) und LeBlanc et al. (2007), die *Escherichia coli*, auch in geringen Keimmengen und Mischkulturen, als wichtigen Erreger bei infertilen Stuten sehen.

Als der wichtigste Erreger im Rahmen bakteriell bedingter Endometritiden bei der Stute gelten β -hämolyisierende Streptokokken (Watson, 2000; Causey, 2006; Riddle et al., 2007; Wittenbrink et al., 2008), da sie in vielen Untersuchungen auf diesem Gebiet die am häufigsten nachgewiesenen fakultativ pathogenen Keime darstellen (Bain, 1966, Merkt und von Lepel, 1970; Pohl et al., 1977; Merkt et al., 1980b; Wingfield Digby und Ricketts, 1982; Koskinen und Katila, 1987; Merkt et al., 1987; Ricketts und Mackintosh, 1987; Purswell et al., 1989; Waelchi et al., 1988; Waelchi et al., 1993; Langoni et al., 1997; Baranski et al., 2003; Riddle et al., 2007; Frontoso et al., 2008).

In dieser Studie liegt ihr Anteil mit 26 % unter dem von *Escherichia coli* mit 33 %. Dieser Wert ist allerdings nicht als auffällig niedrig zu bezeichnen. Die Angaben in der Literatur schwanken zwischen 8 - 10 % (Pohl et al., 1977; Møller Nielsen, 2005) bis hin zu 75 % (Merkt et al., 1980b). Üblicherweise liegen die Nachweishäufigkeiten in einer Größenordnung um die 30 % (Wingfield Digby und Ricketts, 1982; Baranski

Diskussion

et al., 2003; LeBlanc et al., 2007; Riddle et al., 2007; Frontoso et al., 2008), was nur unwesentlich mehr ist als der in dieser Studie ermittelte Wert.

Eine Erklärung für den häufigeren Nachweis von *Escherichia coli* gegenüber β -hämolisierenden Streptokokken könnte sein, dass es sich bei vielen Proben um Kontrolltupfer nach abgeschlossener antibiotischer Behandlung aufgrund des Nachweises von pathogenen Keimen in vorangegangenen bakteriologischen Untersuchungen handelte. Hierbei wurden oftmals β -hämolisierende Streptokokken antibiotisch therapiert, während gegen *Escherichia coli* nur beim Nachweis in Reinkultur, was nur in 20 % der Nachweise der Fall war, vorgegangen wurde. Dies könnte zu einer wesentlichen Reduzierung der Nachweise an β -hämolisierenden Streptokokken geführt haben.

Der Anteil an Nachweisen in Reinkultur betrug wie bei *Escherichia coli* 20 %, bei 60 % konnte zusätzlich ein Wachstum von anderen fakultativ pathogenen Keimen, überwiegend *Escherichia coli*, und bei 21 % ein Wachstum von apathogenen Erregern festgestellt werden. Im Vergleich dazu lag der Anteil an Reinkulturen bei Wingfield Digby und Ricketts (1982) bei 37 %, bei LeBlanc et al. (2007) bei 56 %.

Pseudomonas und *Klebsiella spp.* werden übereinstimmend als pathogene Keime in uterinen Proben von Stuten angesehen (Bain, 1966; Shin et al., 1979; Merkt et al., 1987; Frontoso et al., 2008; Klein et al., 2009). Ihre Nachweishäufigkeit betrug jeweils 5 %. Diese Werte liegen knapp über denen anderer Veröffentlichungen (Merkt und von Lepel, 1970; Pohl et al., 1977; Wingfield Digby und Ricketts, 1982; Waelchi et al., 1988; Baranski et al., 2003; Frontoso et al., 2008). In nur wenigen Untersuchungen wurden höhere Befallsraten nachgewiesen (Merkt et al., 1980b, 1987; Riddle et al., 2007). Trotzdem lassen diese Werte vermuten, dass *Pseudomonas* und *Klebsiella spp.*, bezogen auf die Häufigkeit des Nachweises, als Erreger von Endometritiden nur eine untergeordnete Rolle spielen. Die höheren Befallsraten mit diesen Erregern aus den Studien von Merkt et al. (1980b, 1987) und Riddle et al. (2007) könnten daher rühren, dass diese Untersuchungen ausschließlich an Vollblutstuten durchgeführt wurden. Diese werden bis auf wenige Ausnahmen aufgrund von züchterischen Bestimmungen im Natursprung belegt. Da bekannt ist, dass diese beiden Keimarten zum Großteil während des natürlichen Deckaktes übertragen werden und die Hengste oftmals als symptomlos infizierte

Carrier fungieren (Merkt et al., 1980b; Atherton und Pitt, 1982; Blanchard et al., 1987; Klug und Sieme, 1992), könnte diese Tatsache eine Rolle gespielt haben.

5.4 Zytologische Untersuchungen

5.4.1 Zytologische Parameter im Entnahmesystemvergleich

Im Hinblick auf die diagnostische Hilfestellung, die eine Endometriumszytologie im Rahmen der gynäkologischen Untersuchung von Zuchtstuten geben kann, sollte ein dafür verwendetes Entnahmesystem folgende Kriterien erfüllen:

- Zuverlässige Gewinnung einer ausreichenden Menge an Zellmaterial
- Entnommene Zellen sollten morphologisch möglichst intakt und somit gut zu differenzieren sein
- Entzündungszellen, falls vorhanden, werden sicher nachgewiesen

Daher erfolgte ein Vergleich der Systeme hinsichtlich der Kriterien Anzahl auswertbarer Proben und Morphologie der Zelldarstellung. Zusätzlich wurde die Menge an Erythrozyten pro Ausstrich geschätzt, die als Indikator für die Invasivität des jeweiligen Verfahrens angesehen wurde (Bourke et al., 1997). Da bekannt ist, dass der Nachweis von Erythrozyten außer im peripartalen Zeitraum (Crickman und Pough, 1986; Dascanio et al., 1997) zumeist auf ein entnahmebedingtes Trauma zurückzuführen ist (Wingfield Digby, 1978; Dascanio et al., 1997), wurde aufgrund der eingeschränkten zusätzlichen diagnostischen Aussagekraft von einer zeitaufwändigen Auszählung der Erythrozyten abgesehen und eine Schätzung für ausreichend erachtet. Diese Methodik entspricht der Vorgehensweise anderer Autoren (Ehlers, 2000).

Es zeigte sich, dass der Knudsen-Katheter den mit Abstand höchsten Anteil an nicht auswertbaren Proben lieferte. Dieses war nahezu ausschließlich darin begründet, dass nicht genügend Zellmaterial für eine aussagekräftige Untersuchung gewonnen werden konnte. Da dies bei den anderen beiden Systemen kaum der Fall war, ist die Ursache wahrscheinlich darin zu sehen, dass die glatte Oberfläche der Metallspirale des Knudsen-Katheters bei einer weniger stark ausgeprägten endometrialen Sekretion nicht dazu in der Lage ist, genügend Zellmaterial von der Oberfläche des

Diskussion

Endometriums aufzunehmen. War die Metallspirale ausreichend mit Sekret benetzt, dann lieferte dieses System Ausstriche von guter Qualität. Nur zwei von 207 Proben konnten aufgrund zu starker Zelldeformationen nicht ausgewertet werden. Außerdem war der Knudsen-Katheter dasjenige System, welches den höchsten Prozentsatz an Zytologien ohne Deformationen aufwies.

Beim Uteruskulturtupfer waren 21,9 % der Proben nicht auswertbar. Dies war überwiegend in zu starken Zelldeformationen (18,4 %) begründet, nur in sieben Fällen (3,5 %) wegen einer ungenügenden Menge an Abstrichmaterial im Ausstrich. Auch von den auswertbaren Ausstrichen wiesen 91,1 % entweder teilweise (40,1 %) oder überwiegend (51 %) Deformationen auf. Das Baumwolltupfer zu Deformationen und Verformungen an den Zellen führen ist bekannt (Britton 1982; Couto und Hughes, 1984; Brook, 1985; Bourke et al., 1997; Dascanio et al. 1997). Diese mechanischen Beschädigungen entstehen vor allem während der Entnahme aus dem Uterus und durch den Druck beim Ausrollen auf den Objektträger (Couto und Hughes, 1984; Dascanio et al., 1997). Durch zu vorsichtiges Ausrollen kann es vermehrt zu einer Häufchenbildung der Zellen kommen, zu straffes Ausrollen führt zu Verformungen, Deformationen und kaputten Zellkernen (Britton, 1982). Da diese Beobachtungen auch von anderen Autoren gemacht wurden, ist davon auszugehen, dass die Ursachen der Deformationen eher durch das Entnahmesystem bedingt und nicht auf eine unsachgemäße Probenentnahme- und Aufbereitung zurückzuführen sind. Viele Autoren empfehlen deshalb, Baumwolltupfer vor der Entnahme mit einigen Tropfen steriler Kochsalzlösung zu benetzen. Dies soll sowohl die Menge und Qualität, als auch die Struktur und Integrität der gewonnenen Zellen erhöhen (Merkt und von Lepel, 1970; Pohl et al., 1977; Crickman und Pough, 1986; Saltiel et al., 1987; Waelchi et al., 1988; Dascanio et al., 1997; Dascanio, 2003). Eine weitere Theorie ist, dass trockene Tupfer feuchtigkeitsabstoßend wirken und deshalb schlechter Genitalsekret aufnehmen (Merkt und von Lepel, 1970; Merkt et al., 1980). Bessere Ergebnisse sollen sich mit Calcium-Alginat-Tupfern erzielen lassen (Allen und Newcombe, 1979; Couto und Hughes, 1984; Brooke, 1985; Dascanio, 2003). Da direkte Vergleiche von Entnahmen mit trockenen und angefeuchteten Tupfern bei der Stute bisher nicht existieren, sollten sich weitere Untersuchungen anschließen, um diese offene Fragestellung zu klären.

Die mit dem CytologyBrush[®] entnommenen Proben waren bis auf drei geringzellige Ausstriche alle auswertbar. Dies stimmt mit Untersuchungen von Bourke et al. (1997), Kasimanickam et al. (1999) und Raab (2004) überein. Nur 26 % der Proben wiesen teilweise oder überwiegend Deformationen auf, mussten deswegen jedoch nicht von der Studie ausgeschlossen werden. Der CytologyBrush[®] schnitt somit bei den Kriterien Anzahl auswertbarer Proben und Morphologie der Zelldarstellung am besten ab. Dies bestätigt Ergebnisse von Bourke et al. (1997), die ebenfalls feststellten, dass ein Baumwolltupfer signifikant mehr Deformationen an den Endometriumszellen von Stuten verursacht als ein CytoBrush. Aufgrund ähnlicher Erkenntnisse hat sich dieses Verfahren bei der Entnahme von Endozervikalzytologien bei Frauen gegenüber Baumwolltupfern durchgesetzt (Glenthoj et al., 1986; Trimbos und Arentz, 1986).

Im Gegensatz zum Knudsen-Katheter (69,6 %) und Uteruskulturtupfer (71,3 %) waren nur in 11,6 % der Ausstriche mit dem CytologyBrush[®] keine Erythrozyten nachzuweisen. Größere Mengen an Erythrozyten finden sich üblicherweise im frühen postpartalen Zeitraum (Crickman und Pough, 1986) und mitunter im Östrus (Couto und Hughes, 1984), können aber auch auf eine Endometritis hindeuten (Wingfield Digby, 1978). Als Ursache für die erhöhte Anzahl an Erythrozyten in den Zytologien mit dem CytologyBrush[®] werden in Übereinstimmung mit Wingfield Digby (1978) und Bourke et al. (1997) durch die Bürstchen gesetzte kleine Traumata angesehen. Dies deutet darauf hin, dass dieses Verfahren invasiver ist als die beiden anderen. Da sich aber bei den Stuten in nachfolgenden gynäkologischen Untersuchungen zu keiner Zeit Hinweise auf entnahmebedingte endometriale Blutungen fanden, kann dieser Aspekt vernachlässigt werden. Zudem könnte es in diesem Zusammenhang von Bedeutung sein, dass der CytologyBrush[®] immer direkt nach dem Uteruskulturtupfer zum Einsatz kam, da die äußere Hülle des Tupfers auch zum Einführen des Brushes in den Uterus genutzt wurde. Es ist anzunehmen, dass bereits durch den Tupfer kleine Läsionen gesetzt wurden, weshalb dann mit dem CytologyBrush[®] gehäuft Erythrozyten nachgewiesen wurden.

5.4.2 Paarvergleich der Entnahmesysteme

Im direkten Vergleich zeigte sich, dass der CytologyBrush[®] hoch signifikant mehr Endometriumszellen pro Gesichtsfeld detektierte als der Knudsen-Katheter und der Uteruskulturtupfer. Zwischen Knudsen-Katheter und Uteruskulturtupfer bestand kein signifikanter Unterschied. Bourke et al. (1997) konnten ebenfalls mit einem Brush signifikant mehr Endometriumszellen pro Gesichtsfeld bei Stuten nachweisen als mit einem Baumwolltupfer. Die Werte entsprechen nahezu denen in der vorliegenden Studie, was dafür spricht, dass die erzielten Ergebnisse repräsentativ sind.

Zwischen der Anzahl an gewonnenen Endometriumszellen pro Gesichtsfeld beim CytologyBrush[®] und Uteruskulturtupfer bestand eine signifikant positive Korrelation. Wurden also mit dem CytologyBrush[®] viele Zellen nachgewiesen, so gelang dies auch mit dem Uteruskulturtupfer. Individuelle Unterschiede zwischen den Stuten, die zu einer unterschiedlich starken Exfoliation von Endometriumszellen führten, wurden demnach gleichermaßen von beiden Systemen erfasst. Dies belegt, dass es nicht von der Stute abhängig war, mit welchem System sich mehr Zellen gewinnen ließen, sondern vom Entnahmesystem selbst.

Da mit dem CytologyBrush[®] quantitativ die deutlich größte Zellaufnahme gelang, war zu erwarten, dass sich hiermit auch mehr neutrophile Granulozyten pro Gesichtsfeld nachweisen lassen als mit den beiden anderen Systemen. Dies war allerdings nur im Vergleich zum Uteruskulturtupfer der Fall. In Ausstrichen des Knudsen-Katheters hingegen fanden sich sogar signifikant mehr neutrophile Granulozyten pro Gesichtsfeld als im CytologyBrush[®]. Der Median-Wert lag in beiden Systemen bei 0, was deutlich macht, dass eine Interpretation des Mittelwertvergleichs statistisch nur bedingt aussagefähig war, da er durch einzelne Extrem-Werte (wie an den hohen Standardabweichungen zu erkennen) stark beeinflusst wurde. Berücksichtigung fand dieser Aspekt in einer zusätzlichen Auswertung, in der ein Befund von über 0,5 % neutrophile Granulozyten als zytologisch positiv und unter 0,5 % als zytologisch negativ galt. Auch hier war der Unterschied im Chi-Quadrat-Test statistisch signifikant. Da sich aber bei der Prüfung auf Symmetrie im McNemar-Test keine signifikante Abweichung zeigte, ließ sich statistisch nicht beweisen, dass der Knudsen-Katheter signifikant häufiger ein positives zytologisches Ergebnis brachte als der CytologyBrush[®].

Der häufigere Nachweis von Entzündungszellen mit dem Knudsen-Katheter gegenüber dem CytologyBrush® könnte darin begründet liegen, dass die Metallspirale des Knudsen-Katheters eine deutlich größere Aufnahmefläche besitzt als die Bürste des CytologyBrush®. Dadurch kann Zellmaterial von einer größeren Oberfläche des Endometriums gewonnen werden als mit dem Brush. Es könnte sein, dass damit die Entnahme von Zellmaterial aus lokal entzündeten Arealen gelang, die mit dem CytologyBrush® nicht erfasst wurden.

Sehr deutlich war das Ergebnis beim Vergleich mit dem Uteruskulturtupfer. Mit dem Knudsen-Katheter konnten hochsignifikant mehr neutrophile Granulozyten pro Gesichtsfeld nachgewiesen werden als mit dem Uteruskulturtupfer. Bei der Einteilung der Ausstriche in zytologisch positiv oder negativ zeigte sich ebenfalls, dass der Knudsen-Katheter hochsignifikant häufiger ein zytologisch positives Ergebnis brachte. In keinem Fall konnte der Uteruskulturtupfer Entzündungszellen detektieren, wenn das Ergebnis im Knudsen-Katheter negativ war.

Diese Ergebnisse wurden beim Vergleich zwischen CytologyBrush® und Uteruskulturtupfer bestätigt. Der Brush wies hochsignifikant mehr neutrophile Granulozyten pro Gesichtsfeld nach als der Uteruskulturtupfer, ebenfalls brachte er hochsignifikant häufiger ein positives zytologisches Ergebnis.

Der Uteruskulturtupfer war also sowohl dem Knudsen-Katheter als auch dem CytologyBrush® beim Nachweis von neutrophilen Granulozyten deutlich unterlegen. Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit ist davon abzuraten, den Uteruskulturtupfer zum Nachweis entzündlicher Reaktionen des Endometriums zu nutzen. Dieser Einschätzung widersprechen Ergebnisse von Bourke et al. (1997). Sie konnten nicht feststellen, dass ein CytoBrush häufiger neutrophile Granulozyten nachweist als ein Baumwolltupfer. Da der Umfang des Patientenkollektivs mit 13 Stuten in deren Studie aber als gering einzustufen ist, wird die Aussagekraft der vorliegenden Studie höher eingeschätzt. Berücksichtigt werden muss jedoch, dass in den verglichenen Studien nicht vollkommen identische Baumwolltupfer verwendet wurden, was einen Einfluss auf das Ergebnis ausgeübt haben könnte.

Viele Autoren, die einen Tupfer zum Nachweis von Entzündungszellen für ausreichend erachten (Pohl et al., 1977; Couto und Hughes, 1984; Brook, 1985; Waelchi et al., 1988; Dascanio et al., 1997; Dascanio, 2003), verwenden hierfür

Diskussion

angefeuchtete oder Calcium-Alginat-Tupfer, so dass zu klären wäre, ob diese bessere Ergebnisse bringen als trockene. Hierfür wären weitere Untersuchungen notwendig.

In Bezug auf die Kriterien Anzahl auswertbarer Proben, Qualität der Zelldarstellung und Nachweis von neutrophilen Granulozyten hat sich der CytologyBrush® in dieser Studie als das am besten geeignete System erwiesen. Es gelang nahezu immer auswertbare Proben zu gewinnen, es wurden nur selten stärkere Deformationen festgestellt und neutrophile Granulozyten wurden hochsignifikant häufiger als mit dem Uteruskulturtupfer detektiert. Der Knudsen-Katheter wies im direkten Vergleich zwar häufiger eine Entzündung des Endometriums nach, der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant.

Von Nachteil ist, dass der CytologyBrush® nur für die Anfertigung zytologischer Ausstriche konzipiert ist, während für eine oftmals gleichzeitig durchzuführende bakteriologische Probenentnahme ein separates Tupfersystem benötigt wird. Für die Einführung des Brushes in den Uterus wurde die äußere Hülle des Uteruskulturtupfers, mit dem zuvor eine bakteriologische und/oder zytologische entnommen wurde, genutzt. Dieses Verfahren ließ sich zwar praktisch gut durchführen, allerdings wird eine zusätzliche Hilfsperson zum Anreichen des Brushes und Entgegennahme des Uteruskulturtupfers benötigt. Dies sollte neben der erhöhten Menge an Verbrauchsmaterial und den zusätzlichen Kosten für den Brush berücksichtigt werden. Aus diagnostischer Sicht ist der CytologyBrush® jedoch den anderen beiden Systemen vorzuziehen.

Wenn der Knudsen-Katheter ausreichend mit Sekret benetzt war, lieferte dieses System Ausstriche von guter Qualität. Neutrophile Granulozyten wurden sogar häufiger nachgewiesen als mit dem CytologyBrush®, auch wenn der Unterschied nicht signifikant war. Der Anteil nicht auswertbarer Proben aufgrund von zu wenig Zellmaterial war mit 35,7 % allerdings nicht akzeptabel, da so mehr als jede dritte Probe nicht auswertbar war. Verbesserungen wären hier eventuell mit einer Modifizierung der Aufnahmefläche der Metallspirale zu erzielen. Grundsätzlich ist der Knudsen-Katheter von der Handhabung her gut zur Entnahme von Endometriumszytologien geeignet (Wehrend et al., 2006). Zudem kann er autoklaviert und somit vielfach wiederverwendet werden. Hierzu wird jedoch ein recht

großer Autoklav benötigt, der meist nur in größeren Kliniken vorhanden ist und den Gebrauch dieses Systems in der Praxis bisher einschränkt. Ein großer Vorteil ist, dass in einem Arbeitsgang Material für eine bakteriologische und zytologische Untersuchung gewonnen werden kann.

Der Uteruskulturtupfer wies gegenüber dem Knudsen-Katheter und dem CytologyBrush® erhebliche Defizite beim Nachweis von neutrophilen Granulozyten und in der Qualität der Zelldarstellung auf und wird aufgrund dieser Ergebnisse zur Entnahme von Endometriumszytologien bei Zuchtstuten nicht empfohlen.

5.5 Zusammenhang zwischen zytologischen Ergebnissen und anamnestischen Daten

Auffällig war, dass Stuten in der Fohlenrosse häufiger ein zytologisch positives Ergebnis aufwiesen als Stuten, die im Östrus oder Diöstrus untersucht wurden. Obwohl der Unterschied statistisch nicht signifikant war, bestätigt dies Resultat vorangegangene Untersuchungen (Wingfield Digby, 1978; Mattos et al., 1984; Brook, 1985; Koskinen und Katila, 1987; Saltiel et al., 1987; McCue und Hughes, 1990; Baranski et al., 2003; Dascanio, 2003), die ein erhöhtes Vorkommen von neutrophilen Granulozyten als physiologischen Prozess im Rahmen der puerperalen Selbstreinigungs- und Involutionvorgänge beschreiben. Bis zum neunten Tag post partum sollte die Anzahl an Entzündungszellen jedoch kontinuierlich so stark abnehmen, dass zu diesem Zeitpunkt keine oder nur noch vereinzelt neutrophile Granulozyten gefunden werden können (Knudsen, 1964; Saltiel et al., 1987; Dascanio, 2003).

Stuten, die zwischen Tag sieben und neun post partum zytologisch negativ waren, wiesen nach Brook (1985) und Baranski et al. (2003) höhere Trächtigkeitsraten bei einer Belegung in der Fohlenrosse auf als Stuten, bei denen zu diesem Zeitpunkt Entzündungszellen nachgewiesen werden konnten. Demgegenüber konnten McCue und Hughes (1990) bei 93,8 % (Kontrollgruppe) bzw. 78,9 % (Uteruslavage mit 10 Liter isotonischer Kochsalzlösung an Tag zwei und vier post partum) der Stuten am siebten Tag post partum neutrophile Granulozyten detektieren und raten davon ab, die Entscheidung für eine Belegung in der Fohlenrosse allein vom Ergebnis der

Diskussion

bakteriologischen und zytologischen Untersuchung an diesem Tag abhängig zu machen. Auch Koskinen und Katila (1987) konnten keinen Unterschied in der Trächtigkeitsrate bei Stuten mit zytologisch negativem oder positivem Befund an Tag zwei, fünf und neun post partum feststellen.

Dennoch kann eine zytologische Beurteilung des Endometriums ergänzend zur klinischen Untersuchung wertvolle Hinweise auf den Zustand der Involution des Uterus liefern und als Entscheidungshilfe für die Besamungsstrategie in der Fohlenrosse genutzt werden (Baranski et al., 2003).

Endometriumszysten gelten als nichtentzündliche, degenerative Alterationen des Endometriums von Stuten, die sich in Form von Lymphangieektasien, Lymphzysten, glandulären Zysten und Phlebektasien darstellen (Kenney und Doig, 1986; Kaspar et al., 1987; Schoon et al., 1993). Sie sind ein relativ häufiger Befund im Genitale von Stuten (Wilson, 1985; Brook und Frankel, 1987; Kasper et al., 1987) und treten überwiegend ab einem Alter von 10 Jahren auf (Kaspar et al., 1987; Leidl et al., 1987; Eilts et al., 1995).

In dieser Studie konnten bei Stuten mit intrauterinen Zysten bei der Entnahme der Zytologien mit dem Knudsen-Katheter hochsignifikant häufiger neutrophile Granulozyten nachgewiesen werden als bei Stuten ohne diese Gynäkopathie. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass mit den Zysten entzündliche Prozesse assoziiert sind. Da sich diese Beobachtungen bei der Entnahme der Zytologien mit dem CytologyBrush® und dem Uteruskulturtupfer nicht bestätigten, sollte dieses Ergebnis jedoch nicht überbewertet, sondern muss in weitergehenden Untersuchungen überprüft werden. Bisher gibt es in der Literatur keine Hinweise darauf, dass Stuten mit Uteruszysten häufiger an einer Endometritis leiden. So konnten Leidl et al. (1987) lediglich bei 27,3 % der Stuten mit Zysten in einer bakteriologischen Untersuchung Erreger nachweisen, während in der Kontrollgruppe ohne Zysten 40 % der Tiere bakteriologisch positiv waren. Dies bestätigt Ergebnisse von Kaspar et al. (1987), die in histologischen Präparaten von Stuten mit Endometriumszysten keine Anzeichen von Entzündungen fanden. Vielmehr sind endometriale Zysten pathogenetisch verknüpft mit Alterationen der Uterindrüsen, des Stromas und der Gefäße (Schoon et al., 1993).

Bei der Auswertung der Zytologien, die von Stuten entnommen wurden, bei denen zum Zeitpunkt der Probenentnahme intrauterine Flüssigkeit nachweisbar war, zeigte sich, dass diese nicht signifikant häufiger neutrophile Granulozyten aufwiesen, als Stuten ohne Flüssigkeit. Trotzdem war der Anteil zytologisch positiver Proben bei Probanden mit solchen Veränderungen in allen drei Entnahmesystemen höher gegenüber Stuten ohne pathologisch veränderten Uterusinhalt.

Flüssigkeitsansammlungen ohne Nachweis von Entzündungszellen im zytologischen Ausstrich werden als nicht entzündlich eingestuft. Nichtentzündliche Flüssigkeitsansammlungen stellen sich im transrektalen B-Mode-Ultraschallbild anechogen dar (Pycock und Newcombe, 1996a; Reilas et al., 1997; Newcombe, 1998) und sind überwiegend im Östrus nachzuweisen (Allen und Pycock, 1988; Pycock und Newcombe, 1996a; Reilas et al., 1997; Newcombe, 1998; Pycock, 2006). Geringe Mengen lassen sich mitunter auch bei genitalgesunden Stuten zu Beginn des Östrus im Zuge des sich unter Östrogeneinflusses entwickelnden endometrialen Ödems detektieren (Allen und Pycock, 1988; Pycock et al., 1989). Größere Mengen, auch wenn sie nicht entzündlicher Natur sind, sind dagegen als pathologisch anzusehen und gelten als prädisponierend für Infektionen im Rahmen der Belegung (Causey, 2006). Sie sind kennzeichnend für persistent-breeding-induced-endometritis empfängliche Stuten (Allen und Pycock, 1988; Allen und Boyd, 1990; Allen, 1991; Brinsko et al., 2003, Causey, 2006). Es erscheint plausibel, dass es sich bei den zytologisch negativen Flüssigkeitsansammlungen wie von Freeman et al. (1990), Reilas et al. (1997), Newcombe (1998) und Pycock (2006) beschrieben, um ein Transsudat der uterinen Gefäße handelt, welches zwar Epithelzellen, nicht aber neutrophile Granulozyten und Bakterien enthält. Rasch et al. (1996) sehen die Ursache einer übermäßigen Produktion von Flüssigkeit im Östrus in gegenüber normalen Stuten vergrößerten Uterindrüsen begründet, die zu einer Hypersekretion von Mukus führen und damit ebenfalls solche Flüssigkeitsansammlungen ohne Nachweis von Entzündungszellen erklären könnten.

Durch die physiologischen Entzündungsprozesse nach der Insemination verwandelt sich dieses Transsudat in ein entzündliches Exsudat (Newcombe, 1998), dass neben überschüssigen Debris, Spermatozoen und Seminalplasma auch zahlreiche Entzündungszellen enthält (Barbacini et al., 2003; Causey, 2006; Pycock, 2006, 2007). Auf solche Prozesse ist wahrscheinlich der hohe Prozentsatz an positiven

Diskussion

Zytologien beim Nachweis von intrauteriner Flüssigkeit zurückzuführen, da einige Proben 24 - 48 Stunden nach der ersten Besamung entnommen wurden, um inflammatorische Reaktionen des Endometriums auf die Insemination bei Problemstuten nachzuweisen. Diese Vermutung wird durch die Resultate von Adams et al. (1987) unterstützt, bei denen das Ergebnis einer Biopsie von Stuten mit Flüssigkeit im Diöstrus häufig eine endometriale Entzündung anzeigte.

Da bei der Auswertung nicht berücksichtigt wurde, ob die Probe im Diöstrus, Östrus oder zeitnah nach einer instrumentellen Insemination entnommen wurde, können diese Theorien mit den vorliegenden Ergebnissen nicht sicher bestätigt werden. Zudem bleibt fraglich, ob der Anteil positiver Ausstriche bei Stuten mit intrauteriner Flüssigkeit bei der Entnahme der Zytologien mit dem Knudsen-Katheter deswegen höher lag als beim CytologyBrush® oder Uteruskulturtupfer, weil er sich besser zum Nachweis neutrophiler Granulozyten eignet (siehe 5.4.2), oder weil tatsächlich der Anteil an Stuten mit entzündlich veränderter Flüssigkeit, die zufällig mit diesem System beprobt wurden, höher war.

5.6 Zusammenhang zwischen bakteriologischer und zytologischer Untersuchung

Eine der Grundfragen dieser Arbeit war es zu überprüfen, inwiefern das zytologische Ergebnis mit dem bakteriologischen Kultivierungsergebnis einer Probe aus dem *Cavum uteri* übereinstimmt und ob es einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Nachweis fakultativ pathogener Keime und dem von Entzündungszellen gibt. Da der Nachweis von Keimen aus dem Uterus allein noch nicht beweist, dass die Stute an einer Endometritis leidet (Kenney, 1978; Hughes, 1980), sollte die zytologische Auswertung die Grundlage für die Beurteilung der Infektiösität ermittelter Keime darstellen (Tillmann und Meinecke, 1980).

Zahlreiche Studien beschreiben eine mehr oder minder enge Korrelation zwischen bakteriologischem und zytologischem Ergebnis bei bakteriell bedingten Endometritiden (Knudsen, 1964; Pohl et al., 1977; Tillmann und Meinecke, 1980; Wingfield Digby und Ricketts, 1982; Knudsen, 1982; Couto und Hughes, 1984; Mattos et al., 1984; Brook, 1985; LaCour und Sprinkle, 1985; Ball et al., 1988; Roszel und Freeman, 1988; Brook, 1992; Langoni et al., 1997; Wehrend et al., 2004; Riddle

et al., 2007). Bei der Interpretation dieser Ergebnisse ist zu berücksichtigen, dass diese nur bedingt miteinander vergleichbar sind, da in den einzelnen Studien fast immer unterschiedliche Maßstäbe, ab wann eine Zytologie als negativ oder positiv anzusehen ist, verwandt wurden. Außerdem geht aus den Studien bis auf wenige Ausnahmen (Wingfield Digby und Ricketts, 1982) nicht hervor, ob es sich bei den bakteriologischen Ergebnissen um Nachweise in Reinkultur oder um Mischkulturen handelt. Desweiteren wurden nicht in allen Untersuchungen bedeckte Tupfersysteme verwendet, was einen erheblichen Einfluss auf die zytologischen und bakteriologischen Befunde ausüben kann (Shin et al., 1979; Blanchard, 1981b; Wingfield Digby und Ricketts, 1982; Aguilar et al., 2005; Klein et al., 2009). In der eigenen Untersuchung wurde das Risiko unbeabsichtigter Kontaminationen durch die Verwendung bedeckter Tupfersysteme minimiert. Der Gefahr einer fehlerhaften Interpretation der Korrelation zwischen bakteriologischem und zytologischem Befund wurde versucht vorzubeugen, indem bei der Auswertung der Vergleiche differenziert wurde, ob es sich den Keimnachweisen um Rein- oder Mischkulturen handelte. Die genaue Vorgehensweise ist in Abschnitt 5.2. beschrieben.

Bei der Auswertung der zytologischen Ergebnisse zeigte sich, dass es keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Anzahl positiver Zytologien dahingehend gab, ob in der parallel entnommenen bakteriologischen Probe keine, nur apathogene oder fakultativ pathogene Keime nachgewiesen wurden. Lediglich bei der Auswertung der Befunde des CytologyBrush[®] war das Ergebnis nur knapp nicht signifikant. Hier waren zytologische Proben mit parallelem Bakteriennachweis doppelt so häufig zytologisch positiv, als wenn in der bakteriologischen Untersuchung kein Keimwachstum beobachtet werden konnte. Eine ähnliche Tendenz ließ sich bei der Entnahme mit dem Uteruskulturtupfer erkennen, auch wenn die Unterschiede weniger stark ausgeprägt waren. Bei Gewinnung der zytologischen Proben mit dem Knudsen-Katheter war die Anzahl positiver Zytologien unabhängig vom Kultivierungsergebnis höher als bei den anderen beiden Systemen.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass auch andere Gründe neben dem Nachweis aerober Bakterien zu einer Entzündung des Endometriums führen können. Außerdem muss ein Bakteriennachweis nicht immer mit Entzündungsanzeichen einhergehen, es kann sich auch um eine opportunistische Keimbesiedlung handeln (Witherspoon et al., 1972; Huchzermeyer et al., 2002). Selbst bei klinisch

Diskussion

genitalgesunden Stuten lassen sich mitunter Keime in der Gebärmutter nachweisen (Hinrichs et al., 1988; Klein et al., 2009). Eine weitere Möglichkeit ist, dass zwar eine bakteriologische Infektion vorlag, jedoch aufgrund einer inadäquaten Probenentnahme nicht erkannt wurde. Dies kann bei einem Baumwolltupfer, der nur mit einem sehr geringen Teil der Oberfläche des Endometriums in Berührung kommt, leicht passieren (Wingfield Digby und Ricketts, 1982; Brook, 1985; Crickman und Pough, 1986; Brook, 1992). Diese These wird durch Ergebnisse von Møller Nielsen (2005) bekräftigt, der nur in 45 % der Proben, in denen eine Uterusbiopsie einen positiven Keimnachweis erbrachte, mit einem Tupfer bakterielle Erreger nachweisen konnte. Außer aeroben Bakterien können etliche andere Faktoren, wie das Vorkommen anaerober Bakterien, eine Pneumovagina, Urin-Ansammlungen im Uterus, Reaktionen auf Sperma und intrauterine Behandlungen mit reizenden Substanzen zu Endometritiden führen (Riddle et al., 2007). Als Erklärung für diese Ergebnisse müssen zudem Kontaminationen aus dem kaudalen Geschlechtstrakt oder bei der Probenaufbereitung in Betracht gezogen werden, die sowohl das bakteriologische als auch das zytologische Ergebnis falsch positiv beeinflussen können (Blanchard et al., 1981b; Aguilar et al., 2005; Klein et al., 2009). Intrauterine Behandlungen mit reizenden Substanzen können in dieser Studie als Ursache nahezu ausgeschlossen werden, da solche Behandlungen auf dem Gestüt nicht praktiziert wurden. Ebenso wurden Tupferproben zur bakteriologischen Untersuchung nur vor der Besamung und nicht unmittelbar danach entnommen. Deshalb sind Reaktionen auf die Insemination als Ursache für positive Zytologien ohne gleichzeitigen Nachweis von Keimen bei diesem Versuchsabschnitt unwahrscheinlich. Als Gründe kommen jedoch intrauterine Flüssigkeitsansammlungen im Östrus, eine Probenentnahme in der Fohlenrosse sowie der Nachweis von uterinen Zysten bei der Entnahme mit dem Knudsen-Katheter in Frage. Von diesen konnte in Abschnitt 4.4. nachgewiesen werden, dass sie zum Teil häufiger mit endometrialen Entzündungsreaktionen assoziiert sind.

Dass β -hämolisierende Streptokokken zu Recht als die wichtigsten Erreger im Rahmen bakteriell bedingter Endometritiden bei der Stute gelten (Wingfield Digby und Ricketts, 1982; Koskinen und Katila, 1987; Watson, 2000; Causey, 2006; Wittenbrink et al., 2008) wird durch die Ergebnisse in der vorliegenden Studie bestätigt. So zeigte sich, dass nur Proben, in denen β -hämolisierende Streptokokken nachgewiesen wurden, signifikant häufiger im CytologyBrush[®] zytologisch positiv

waren als Ausstriche, bei denen in der parallel entnommenen bakteriologischen Untersuchung dieser Keim nicht nachzuweisen war.

Erstmalig wurde zudem gezeigt, dass bei steigendem Keimgehalt an β -hämolisierenden Streptokokken auch die Anzahl neutrophiler Granulozyten im Ausstrich anstieg. Es lag also eine signifikant positive Korrelation zwischen der Befallsstärke und der Stärke der Entzündungsreaktion vor. Solche Untersuchungen zum Einfluss des Keimgehaltes auf die Anzahl nachzuweisender Entzündungszellen existieren in der Literatur bisher noch nicht. Es sollten weitere Arbeiten eingeleitet werden, um diesen interessanten Aspekt weiter zu verfolgen. Der Anteil positiver zytologischer Nachweise bei diesem Erreger betrug in Reinkultur 70 %, in Mischkultur mit pathogenen Keimen 47 % und mit apathogenen Keimen 37 %. Dieser Unterschied war zwar statistisch nicht signifikant, lässt jedoch vermuten, dass die Kultivierung in Reinkultur häufiger zu Reaktionen des Endometriums führt, als wenn zusätzlich noch andere Keime angezüchtet werden. Demgegenüber konnten Wingfield Digby und Ricketts (1982) beim Nachweis von β -Streptokokken in Reinkultur nur bei 18 % Entzündungszellen, beim Nachweis in Mischkultur bei 22 % Entzündungszellen detektieren. Auch hier sollten sich weitere Arbeiten anschließen. Es wird zwar häufig angenommen, dass ein Wachstum in Reinkultur als pathogener einzustufen ist, Studien, die diese Zusammenhänge belegen, gibt es jedoch kaum.

Die weit verbreitete Meinung, dass der Nachweis von *Escherichia coli* nur in Reinkultur und bei hochgradigem Keimgehalt als pathogen anzusehen ist (Ricketts, 1981; Møller Nielsen, 2005), kann aufgrund der hier erzielten Ergebnisse nicht bestätigt werden. So konnte eine Korrelation zwischen der Befallsstärke und dem Gehalt an neutrophilen Granulozyten in der Zytologie nicht nachgewiesen werden. Der Anteil an positiven Zytologien beim Nachweis in Reinkultur lag mit 37 % zwar höher als die 13 % beim Nachweis in Mischkultur mit apathogenen Keimen, ist jedoch nicht als sonderlich hoch einzustufen. Wingfield Digby und Ricketts (1982) konnten sogar nur bei 11 % und Waelchi et al. (1993) nur bei 12,5 % der Nachweise in Reinkulturen Entzündungszellen nachweisen.

Für aussagekräftigere Ergebnisse wären jedoch Untersuchungen mit größeren Fallzahlen nötig. Diese wurden in dieser Untersuchung durch die Aufteilung der zytologischen Ergebnisse auf drei Systeme leider erheblich reduziert.

5.7 Einflussfaktoren auf das Trächtigkeitsergebnis

In der Literatur finden sich zahlreiche Studien, die den Zusammenhang anamnestisch erhobener Parameter (LaCour und Sprinkle, 1985; Heilkenbrinker et al., 1997; Riddle et al., 2007), sowie der Ergebnisse der klinisch-gynäkologischen Untersuchung (Adams et al., 1987; Leidl et al., 1987; McKinnon, 1988; Eilts et al., 1995; Reilas et al., 1997; LeBlanc et al., 1998; Troedsson, 1999; Schilela et al., 2001; Barbacini et al., 2003; Brinsko et al., 2003; Malschitzky et al., 2003; Hemberg et al., 2005; Pycock, 2006; Cuervo-Arango, 2007; Pansegrau et al., 2008), der bakteriologischen (Brook, 1985; Saltiel et al., 1987; Baranski et al., 2003; Riddle et al., 2007) und der zytologischen Untersuchung (Mattos et al., 1984; Brook, 1985; LaCour und Sprinkle, 1985; Koskinen und Katila, 1987; Saltiel et al., 1987; McCue und Hughes, 1990; Baranski et al., 2003; Riddle et al., 2007; Pansegrau et al., 2008) auf die Trächtigkeitsrate von Stuten untersucht haben.

In der vorliegenden Arbeit konnte von den untersuchten Parametern Nachweis von neutrophilen Granulozyten und Erythrozyten in der Zytologie, Nachweis fakultativ pathogener Keime in der bakteriologischen Untersuchung, Alter, anamnestische Daten, intrauterine Flüssigkeit und Zysten nur für den Nachweis von intrauterinen Flüssigkeitsansammlungen vor der Besamung ein signifikanter Einfluss auf die Trächtigkeitsrate dahingehend nachgewiesen werden, dass Stuten mit solchen Befunden signifikant seltener tragend wurden.

Dies unterstreicht die Bedeutung einer gestörten Selbstentleerung, die wiederum als Risikofaktor für eine sogenannte post-breeding-induced-endometritis gilt, auf die Fertilität betroffener Stuten (Evans et al., 1986; Allen und Pycock, 1988; Troedsson und Liu, 1991). Während geringe intrauterine Flüssigkeitsansammlungen zu Rossebeginn gelegentlich auch bei gesunden Stuten detektiert werden (Allen und Pycock, 1988; Pycock et al., 1989), sind größere Mengen im Östrus immer als pathologisch einzustufen (Causey, 2006).

Untersuchungen von Troedsson (1997), Schilela et al. (2001) und Brinsko et al. (2003) zeigten, dass präovulatorisch vorbelastete Stuten auch postovulatorisch signifikant häufiger Flüssigkeit in der Gebärmutter akkumulieren. Deshalb ist davon auszugehen, dass die in dieser Studie bereits vor der ersten Besamung festgestellten Flüssigkeitsansammlungen auch nach der Insemination fortbestanden,

wenn nicht sogar zunehmen. Solche Befunde sind typischerweise bei Stuten zu erheben, die als gefährdet für die Entwicklung einer post-breeding-induced-endometritis eingestuft werden (Card, 2005). So fanden Brinsko et al. (2003) heraus, dass sämtliche Stuten, die bereits im Östrus Flüssigkeitsansammlungen von über 2 cm Durchmesser aufwiesen, nach der Belegung eine post-breeding-induced-endometritis entwickelten. Nach Meinung dieser Autoren erhält man somit schon vor der Besamung einen sicheren Indikator auf solch eine nachfolgende Problematik.

Gründe für die Retention von Flüssigkeit im Uterus sind ein nach ventral abgesenkter, schlaffer Uterus (LeBlanc, 2008), mangelhafte Lymphdrainage, zervikale Inkompetenz (LeBlanc et al., 1994a), dilatierte Uterushörner nach der Geburt (Newcombe, 1998) und intrinsisch bedingte Kontraktionsdefekte des Myometriums (Rigby et al., 2001). Durch die mangelhafte uterine Clearance verbleibt Flüssigkeit, die normale Stuten bereits 6 - 12 Stunden nach der Belegung eliminieren (Troedsson, 1997), über mehrere Tage im Uteruslumen und die Stute entwickelt in der Folge eine belegungsinduzierte Endometritis.

Der negative Einfluss von intrauterinen Flüssigkeitsansammlungen während der Ovulationsperiode auf die Trächtigkeits- und Embryonenüberlebensrate zwischen Tag 11 und 20 post ovulationem wird von zahlreichen Autoren bestätigt (Adams et al., 1987; McKinnon et al., 1988; Pycock und Newcombe, 1996; Troedsson, 1999; Watson, 2000; Barbacini et al., 2003; Malschitzky et al., 2003; Pycock, 2006).

Die Ursachen, warum intrauterine Flüssigkeit und die häufig damit assoziierten persistierenden Infektionen zu verminderten Fertilisations- und Überlebensraten der Embryonen führen, sind noch nicht vollständig geklärt. So konnte zwar in vitro eine direkte spermizide Wirkung von intrauteriner Flüssigkeit auf Spermatozoen nachgewiesen werden (McKinnon et al., 1988; Squires et al., 1989), allerdings konnte dies in vivo bisher nicht eindeutig bestätigt werden (Reilas et al., 1997). Als sicher gilt, dass der Fortbestand entzündlicher Prozesse bis einschließlich Tag 5 nach der Fertilisation, an dem der Embryo aus dem Eileiter in das *Cavum uteri* absteigt, aufgrund des zytotoxischen Milieus im Uterus dazu führt, dass es nicht zu einer erfolgreichen Implantation kommt oder dass der Embryo frühzeitig abstirbt (Smith et al., 1971; Waites und Bell, 1982; Watson, 2000; Bucca, 2008). Zudem soll eine persistierende Entzündung in diesem Zeitraum zu prämaturer Luteolyse und

Diskussion

dem Verlust eines eventuell vorhandenen Embryos aufgrund erhöhter Prostaglandin $F_{2\alpha}$ -Freisetzung führen (Neely et al., 1979; Pycock, 2006). In diesem Zusammenhang wird auch von reduzierten Progesteron-Konzentrationen zwischen Tag 7 bis 11 und verkürzten interovulatorischen Intervallen bei Stuten mit Flüssigkeit im Diöstrus berichtet (Adams et al., 1987).

Aufgrund dieser aktuellen Erkenntnisse wird heute davon ausgegangen, dass die belegungsinduzierte Endometritis bei empfänglichen Stuten einen häufigeren Grund für Infertilität darstellt als die infektiös bedingten Endometritiden (Pycock, 2006).

Der Einfluss der Zuordnung einer Stute in die Kategorien fohlenführende Stute, Maidenstute, güste Stute, Stute mit Trächtigkeitsstörungen oder mehrjährig nicht besamte Stute erwies sich nur knapp als nicht signifikant für die Ausbildung einer Trächtigkeit.

Fohlenführende Stuten wiesen höhere Trächtigkeitsraten (63 %) auf als Maidenstuten (54 %) und mehrjährig nicht besamte Stuten (54 %). Deutlich geringer lag die Quote bei güsten Stuten (39 %) und Stuten mit Trächtigkeitsstörungen (35 %). Die besseren Trächtigkeitsergebnisse von fohlenführenden Stuten bestätigen Ergebnisse von Riddle et al. (2007) und waren zu erwarten, da diese Stuten mit der Geburt eines lebenden Fohlens in der aktuellen Zuchtsaison bewiesen haben, dass sie zuchttauglich sind. Aufgrund der in der Regel mindestens einjährigen erfolglosen Belegung ist bei güsten Stuten und solchen mit Trächtigkeitsstörungen von schwerwiegenderen Beeinträchtigungen der Reproduktionsgesundheit wie hormonellen Imbalancen, zervikaler Insuffizienz, Störungen des Endometriums oder den Folgen einer Infektionskrankheit auszugehen (LeBlanc, 2008). Diese in der routinemäßigen Untersuchung nicht erfassten möglichen Veränderungen könnten das schlechtere Trächtigkeitsergebnis erklären. Solche Faktoren könnte auch bei einem Teil der Maidenstuten eine Rolle gespielt haben, da es sich hierbei nicht nur um junge, sondern auch Stuten fortgeschrittenen Alters handelte, was jedoch bei der Auswertung nicht berücksichtigt wurde.

Zu beachten ist, dass sich die Ergebnisse der Trächtigkeitsuntersuchung nur auf die Rosse beziehen, in welcher die Probenentnahme erfolgte und somit nicht das endgültige Trächtigkeitsergebnis am Ende der Zuchtsaison widerspiegeln.

Überraschenderweise zeigte sich bei der Auswertung des Zusammenhanges zwischen dem zytologischem- und dem Trächtigkeitsergebnis, dass der Nachweis von Entzündungszellen keinen signifikanten Einfluss auf die Trächtigkeitsrate ausübte. Die Trächtigkeitsrate von Stuten mit positiver Zytologie war sogar höher als diejenige von Stuten mit negativem Befund. Dies steht in Widerspruch zu den Ergebnissen zahlreicher anderer Autoren (Mattos et al., 1984; Brook, 1985; LaCour und Sprinkle, 1985; Baranski et al., 2003; Riddle et al., 2007).

Für die davon abweichenden Ergebnisse in dieser Studie kommen mehrere Gründe in Betracht. Zum einen ist die Schwelle, ab wann eine Zytologie als positiv angesehen wurde, mit einem Prozent-Befund von 0,5 % neutrophile Granulozyten als sehr niedrig anzusehen. Dies entspricht einem Verhältnis von einem neutrophilen Granulozyten auf 200 Endometriumszellen. Bei solch einem Befund ist noch nicht von einer klinisch relevanten Entzündungsreaktion auszugehen. Da jedoch keine weitere Abstufung hinsichtlich der Prozent-Befunde vorgenommen wurde, kann dieser Aspekt hier nicht weiter geklärt werden.

Aufgrund der Einschlusskriterien für die Einbeziehung einer Stute in diese Auswertung (siehe 3.3.2) war es zudem möglich, dass zwischen dem Tag der Probenentnahme der Zytologie und der ersten Besamung ein Zeitraum von bis zu 24 Tagen liegen konnte. Es ist nicht auszuschließen, dass es sich bei einem Teil der aufgedeckten Entzündungen nur um einen vorübergehenden Prozess handelte, der bis zum Zeitpunkt der Insemination bzw. der frühen postovulatorischen Phase bereits abgeklungen war und somit kein Hindernis mehr für eine erfolgreiche Konzeption darstellte. Desweiteren wurden bei Stuten mit deutlichen, zytologisch nachgewiesenen Entzündungsanzeichen umgehend unspezifische therapeutische Maßnahmen (Uterus-Lavage) zur Steigerung der uterinen Abwehrleistung eingeleitet. Lag nach drei bis vier Tagen zudem ein als relevant einzustufender bakteriologischer Befund mit Antibigramm vor, so wurden diese Maßnahmen durch eine spezifische lokale und systemische antibiotische Therapie unterstützt. Pycock und Newcombe (1996b) konnten zeigen, dass solche Behandlungen zu einer signifikant höheren Trächtigkeitsrate führen. Von solchen positiven Effekten auf das Trächtigkeitsergebnis muss auch in dieser Studie ausgegangen werden.

Diskussion

Zwischen dem Nachweis fakultativ pathogener Keime und dem Trächtigkeitsergebnis konnte kein Zusammenhang nachgewiesen werden. Dies unterstreicht, dass eine antibiotische Behandlung aufgrund des alleinigen Nachweises von Keimen ohne klinische oder zytologische Hinweise auf eine Entzündung des Endometriums nur in Ausnahmefällen durchgeführt werden sollte (Knudsen, 1964; Scott et al., 1971; Kenney, 1978; Brook, 1985; Crickman und Pough, 1986). Ein Antibiogramm mit Resistenztest ist unabdingbar (Albihn et al., 2003). Um auszuschließen, dass es sich um eine Kontamination im Rahmen der Entnahme oder eine transiente Keimbesiedlung handelt, wird die Entnahme eines Kontrolltupfers empfohlen (Merk et al. 1980b, 1987).

So kann die unnötige intrauterine Anwendung von Breitbandantibiotika über mehrere Tage zu einer nachfolgenden, oft hartnäckigeren Infektion mit Pilzen führen (Dascanio et al., 2001) und ein Risiko für die zukünftige Reproduktionsgesundheit der Stute darstellen (Walter, 2009). Zudem verursacht dies unnötige Kosten für den Stutenhalter.

5.8 Schlussbetrachtung und Fazit für die Praxis

In dieser Studie zeigte sich, dass der CytologyBrush[®] zur Entnahme und Anfertigung von exfoliativen Endometriumszytologien bei der Stute sehr gut geeignet ist. Aufgrund der Vorteile in den Kriterien Anzahl auswertbarer Proben und Nachweis neutrophiler Granulozyten gegenüber dem Knudsen-Katheter und dem Uteruskulturtupfer wird dieses System zur Anwendung in der Praxis empfohlen.

Mit dem Knudsen-Katheter konnten bis auf die hohe Anzahl nicht auswertbarer Proben aufgrund einer zu geringen Menge an Zellmaterial ebenfalls gute Ergebnisse erzielt werden. Hier wäre in weiteren Untersuchungen zu klären, ob Veränderungen der Entnahmetechnik, wie ein längeres Verweilen des Katheters im *Cavum uteri* oder ein häufigeres Vor- und Zurückziehen der Metallspirale, zu einer Verbesserung bei der Gewinnung von Zellmaterial führen. Möglicherweise könnten auch bauliche Modifikationen an der Oberfläche der Metallspirale Vorteile bringen.

Die negativen Auswirkungen intrauteriner Flüssigkeitsansammlungen nach der Besamung auf die Fertilisations- und Embryonenüberlebensraten von Stuten wurden

bereits in etlichen Studien bestätigt. In dieser Studie führten jedoch schon vor der Besamung nachzuweisende Flüssigkeitsansammlungen zu einer signifikanten Reduktion der Trächtigkeitsrate. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass man so schon vor der ersten Besamung zuverlässige Hinweise auf fertilitätsmindernde Aspekte erhält und frühzeitig intervenieren sollte.

Dagegen macht die Untersuchung des Einflusses der bakteriologischen Befunde auf die Trächtigkeitsrate deutlich, dass auch bei Stuten mit dem Nachweis fakultativ pathogener Keime aus der Gebärmutter mit einem positiven Trächtigkeitsergebnis zu rechnen ist. Intrauterine antibiotische Therapien aufgrund positiver Kultivierungsergebnisse sollten daher nur bei gleichzeitigen klinischen oder zytologischen Hinweisen auf entzündliche Veränderungen des Endometriums durchgeführt werden.

6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es herauszufinden, inwiefern sich drei Systeme (Knudsen-Katheter, CytologyBrush[®], Uteruskulturtupfer) zur intrauterinen Gewinnung von Zytologien bei Zuchtstuten hinsichtlich der Anzahl auswertbarer Proben und dem Nachweis von neutrophilen Granulozyten unterscheiden. Zudem sollte durch eine parallel entnommene Probe zur bakteriologischen Untersuchung ermittelt werden, ob es eine signifikante Korrelation zwischen dem Nachweis fakultativ pathogener Keime und von Entzündungszellen in der exfoliativen Endometriumszytologie gibt. Außerdem war es von Interesse herauszufinden, ob die Ergebnisse der bakteriologischen, zytologischen und gynäkologischen Untersuchung einen Einfluss auf die Trächtigkeitsrate ausüben.

Insgesamt wurden Proben von 340 Stuten entnommen, wobei in 279 Fällen zytologische und bakteriologische Ergebnisse vorlagen.

Folgende relevante Ergebnisse konnten erzielt werden:

Paarvergleich der Entnahmesysteme für Zytologien:

- In der Konfigurationsfrequenzanalyse wurde deutlich, dass der Knudsen-Katheter signifikant mehr Proben liefert, die aufgrund von zu wenig Zellmaterial nicht auswertbar waren, als die beiden anderen Systeme.
- Der Uteruskulturtupfer führte signifikant häufiger zu Deformationen an den Zellen, während im CytologyBrush[®] am meisten Erythrozyten nachzuweisen waren.
- Mit dem CytologyBrush[®] konnten signifikant mehr Endometriumszellen pro Gesichtsfeld detektiert werden als mit dem Knudsen-Katheter und dem Uteruskulturtupfer.
- Der Knudsen-Katheter wies signifikant häufiger ($p < 0,0001$) neutrophile Granulozyten nach als der Uteruskulturtupfer, nicht jedoch als der CytologyBrush[®].

- Der CytologyBrush® wies signifikant häufiger ($p < 0,0001$) neutrophile Granulozyten nach als der Uteruskulturtupfer.

Zusammenhang zwischen zytologischer Untersuchung und Daten aus Anamnese und gynäkologischer Untersuchung:

- Durch Verwendung von keinem der drei Systeme konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen anamnestischen Angaben und dem Nachweis von Entzündungszellen in der Zytologie nachgewiesen werden.
- Bei Stuten mit uterinen Zysten ließ sich bei der Entnahme mit dem Knudsen-Katheter signifikant häufiger ($p = 0,04$) ein positives zytologisches Ergebnis nachweisen als bei Stuten ohne diese Gynäkopathie.

Bakteriologische Untersuchung:

- Die am häufigsten nachgewiesenen Keimarten waren *Escherichia coli* (33 %), β -hämolyisierende Streptokokken (26 %), α -hämolyisierende Streptokokken (17 %), γ -hämolyisierende Streptokokken (12 %) und *Staphylococcus epidermidis* (11 %). Alle anderen Keimarten wurden mit einer Häufigkeit unter 10 % detektiert.

Zusammenhang zwischen bakteriologischer und zytologischer Untersuchung:

- Bei Verwendung des CytologyBrush® ließen sich bei Stuten mit Nachweis von β -hämolyisierenden Streptokokken signifikant häufiger ($p = 0,002$) neutrophile Granulozyten finden als bei Stuten, bei denen keine β -hämolyisierenden Streptokokken nachgewiesen wurden.
- Es zeigte sich eine signifikant positive Korrelation ($r_s = 0,26$; $p = 0,005$) zwischen der Anzahl an Entzündungszellen im zytologischen Ausstrich und einem steigenden Keimgehalt an β -hämolyisierenden Streptokokken bei Verwendung des CytologyBrush®-Systemes.

Zusammenfassung

- Ob β -hämolyisierende Streptokokken und *Escherichia coli* in Reinkultur oder aber in Mischkultur mit pathogenen oder apathogenen Keimen nachgewiesen wurden, hatte keinen signifikanten Einfluss auf das zytologische Ergebnis.

Einflussfaktoren auf das Trächtigkeitsergebnis

- Im Rahmen einer schrittweisen multiplen logistischen Regression zeigte sich, dass Stuten mit intrauterinen Flüssigkeitsansammlungen signifikant ($p = 0,01$) seltener tragend werden.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass von den getesteten Systemen der CytologyBrush[®] am geeignetsten ist, da er den höchsten Anteil auswertbarer Proben lieferte sowie eine signifikante Korrelation zwischen dem Nachweis von neutrophilen Granulozyten und dem Auftreten von β -hämolyisierenden Streptokokken bestand.

7 Summary

The aim of this study was to compare three systems (Knudsen-Catheter, CytologyBrush[®], Endometrial Swab) of intra-uterine sampling for the cytology of breeding mares in order to establish their differences concerning the number of utilizable samples and the detection of neutrophil granulocytes. In addition, a parallel sample for bacteriological testing was taken to find out whether there is a significant correlation between possibly pathogenic bacteria and inflammatory cells detected in exfoliative endometrial cytology. A further question of interest was, whether the results of bacteriological, cytological and gynecological examinations indicated an influence on the rate of pregnancy.

Samples were taken from 340 mares, 279 of which delivered cytological and bacteriological results.

The most relevant of these were the following:

The pairwise comparison of the three sampling systems for cytology showed that:

- In a configuration frequency analysis the Knudsen-Catheter delivered a significantly higher number of samples that failed to be utilizable because of insufficient cell material.
- The Endometrial Swab caused a significantly higher number of cell deformations, whereas the CytologyBrush[®] showed the highest number of erythrocytes.
- The CytologyBrush[®] allowed the detection of a significantly higher number of endometrial cells per field of vision.
- The Knudsen-Catheter allowed the detection of neutrophil granulocytes significantly more often ($p < 0,0001$) than the Endometrial Swab, but not more often than the CytologyBrush[®].

Summary

- The CytologyBrush[®] allowed a significantly more frequent detection ($p < 0,0001$) of neutrophil granulocytes than the Endometrial Swab.

Correlation between cytology and findings from anamnesia and gynecological examinations:

- None of the three systems showed a significant correlation between anamnestic data and the cytological detection of inflammatory cells.
- In breeding mares with uterine cysts the sampling by Knudsen-Catheter led significantly more often ($p = 0,04$) to the detection of positive cytology than on mares free from this gynecopathy.

Bacteriological testing:

- Spezies of bacteria most frequently isolated were *Escherichia coli* (33 %), β -hemolytic Streptococci (26 %), α -hemolytic Streptococci (17 %), γ -hemolytic Streptococci (12 %) and *Stapylococcus epidermidis* (11 %). The frequency of all other species was lower than 10 %.

Correlation between bacteriological and cytological findings:

- Using the CytologyBrush[®] for endometrial sampling, the detection of neutrophil granulocytes occurred significantly more often ($p = 0,002$) on mares with detectable β -hemolytic streptococci than on mares where no β -hemolytic streptococci were found.
- A significantly positive correlation ($r_s = 0,26$; $p = 0,005$) between the number of inflammatory cells detected in the cytological sample and the presence of an increasing number of β -hemolytic streptococci was established with the use of the CytologyBrush[®] system.

- The cytological result remained uninfluenced by the bacteriological detection method whereby β -hemolytic streptococci and *Escherichia coli* were cultivated either in pure isolation or mixed with other pathogenic or non-pathogenic germs.

Influence upon the rate of pregnancy:

- Through a step-by-step multiple logistic regression it was demonstrated that the rate of pregnancy is significantly lower ($p = 0,01$) in mares with intra-uterine fluid accumulations.

In conclusion it is ascertainable that among the three sampling systems that were tested the CytologyBrush[®] is the appropriate, since it delivered the highest number of utilizable samples and allowed to establish a significant correlation between the detection of neutrophil granulocytes and the presence of β -hemolytic streptococci.

8 Literaturverzeichnis

Ackermann, H. (1998)

BiAS für Windows, Biometrische Analyse von Stichproben, Version 7.0

Epsilon-Verlag, Hochheim, Darmstadt

Adams, G.P., Kastelic, J.P., Bergfelt, D.R., Ginther, O.J. (1987)

Effect of uterine inflammation and ultrasonically-detected uterine pathology on fertility in the mare

J. Reprod. Fert., Suppl. 35, 445-454

Aguilar, J., Hanks, M., Shaw, D.J., Else, R., Watson, E. (2005)

Importance of using guarded techniques for the preparation of endometrial cytology smears in mares

Theriogenology, 66, 423-430

Albihn, A., Baverud, V., Magnusson, U. (2003)

Uterine microbiology and antimicrobial susceptibility in isolated bacteria from mares with fertility problems

Acta Vet. Scand., 44, 121-128

Allen, W.E., Newcombe, J.R. (1979)

Aspects of genital infection and swabbing techniques in the mare

Vet. Rec., 104, 228-231

Allen, W.E., Pycock, J.F. (1988)

Cyclical accumulation of uterine fluid in mares with lowered resistance to endometritis

Vet. Rec., 122, 489-490

Allen, W.E., Pycock, J.F. (1989)

Current views on the pathogenesis of bacterial endometritis in mares

Vet. Rec., 125, 298-301

Allen, W.E., Boyd, E.H (1990)

Delayed drainage of neomycin from the uterus of mares susceptible to endometritis

Vet. Rec., 127, 132

Allen, W.E. (1991)

Investigations into the use of exogenous oxytocin for promoting uterine drainage in mares susceptible to endometritis

Vet. Rec., 128, 593-594

Allen, W.E., Bracher, V. (1992)

Videoendoscopic evaluation of the mare's uterus: Findings in the pregnant mare

Equine Vet. J., 24, 185-191

Asbury, A.C. (1982)

The reproductive system

In: Mansmann, R.A., McAllister, E.S., Pratt, P.W. (Hrsg.): Equine Medicine and Surgery

Verlag American Veterinary Publications, Santa Barbara, 3rd ed. Vol. 2, 1305-1402

Asbury, A. C. (1984a)

Endometritis diagnosis in the mare

Equine Vet. Data, 58, 166

Asbury, A.C. (1984b)

Post-breeding treatment of mares utilizing techniques that improve uterine defences against bacteria

Proc. Am. Assoc. Equine Pract., 349-356

Asbury, A.C. (1986)

Endometritis in the Mare

In: Morrow, D.A. (Hrsg.): Current Therapy in Theriogenology, Bd. 2

Saunders, Philadelphia, 718-722

Literaturverzeichnis

Asbury, A.C. (1992)

How effective is your treatment of bacterial endometritis?

Equine Vet. J., 24, 416-417

Asbury, A.C., Lyle, S.K. (1993)

43. Infectious causes of infertility

In: McKinnon, A.O., Voss, J.L. (Hrsg.): Equine Reproduction, 1.Auflage, Lippincott

Williams & Wilkins, Philadelphia, 381-392

Atherton, J.G., Pitt, T.L. (1982)

Types of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from horses

Equine Vet. J., 14, 329-332

Bain, A.M. (1966)

The role of infection in infertility in the thoroughbred mare

Vet. Rec., 78, 168-173

Ball, B.A., Shin, S.J., Patten, V.H., Lein, D.H., Woods, G.L. (1988)

Use of a low-volume uterine flush for microbiologic and cytologic examination of the mare's endometrium

Theriogenology, 29, 1269-1283

Baranski, W., Janowski, T., Ras, A., Podhalicz-Dziegielewska M., Strezezek, R. (2003)

Relationship between bacteriological and cytological examination of the mare's uterus during foal heat and fertility rate

Bull. Vet. Inst. Pulawy, 47, 427-433

Barbacini, S., Necchi, D., Zavaglia, G., Squires, E.L. (2003)

Retrospective study on the incidence of postinsemination uterine fluid in mares inseminated with frozen/thawed semen

Equine Vet. Sci., 23, 493-496

- Barlund, C.S., Carruthers, T.D., Waldner, C.L., Palmer, C.W. (2008)
A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle
Theriogenology, 69, 714-723
- Blanchard, T.L., Garcia, M.C., Hurtgen, J.P., Kenney, R.M. (1981a)
Comparison of two techniques for obtaining endometrial bacteriologic cultures in the mare
Theriogenology, 16, 85-93
- Blanchard, T.L., Cummings, M.R., Garcia, M.C., Hurtgen, J.P. (1981b)
Comparison between two techniques for endometrial swab culture and between biopsy and culture in barren mares
Theriogenology, 16, 541-552
- Blanchard, T.L., Varner, D.D., Love, C.C. (1987)
Use of a semen extender containing antibiotic to improve the fertility of a stallion with seminal vesiculitis due to *Pseudomonas aeruginosa*
Theriogenology, 28, 541
- Bowen, J.M., Tobin, N., Simpson, R.B. (1982)
Effect of washing on the bacterial flora of the stallion's penis
J. Reprod. Fert., Suppl. 32, 41-45
- Bourke, M., Mills, J.N., Barnes, A.L (1997)
Collection of endometrial cells in the mare
Aust. Vet. J., 75 (10), 755-758
- Brinsko, S.P., Rigby, S.I., Varner, D.D., Blanchard, T.L. (2003)
A practical method for recognizing mares susceptible to post- breeding endometritis
Proc. Am. Assoc. Equine Pract., 363-365
- Britton, B.A. (1982)
Endometrial change in the annual reproductive cycle of the mare
J. Reprod. Fert., Suppl. 32, 175-180

Literaturverzeichnis

Brook, D. (1985)

Cytological and bacteriological examination of the mare's endometrium

Equine Vet. Sci., 5, 16-22

Brook, D. (1992)

28. Uterine Cytology

In: McKinnon, A.O., Voss, J.L. (Hrsg.): Equine Reproduction, 1. Auflage, Lippincott

Williams & Wilkins, Philadelphia, 246-254

Brook, D; Frankel, K. (1987)

Electrocoagulative removal of endometrial cysts in the mare

Equine Vet. Sci., 7, 77-81

Bucca, S. (2008)

Endometritis: what's new?

Veterinary Europeane Equine Meeting of the Year 2008, 14. SIVE / FREEVA-Congress, Venezia, 42-48

Byrans, J.J. (1962)

Research on bacterial diseases of horses

Stud Manager's Course Lectures, Lexington, Kentucky

Card, C., Carley, S., Green, J., Chirino-Trejo, M. (2004)

Endometrial cytology in mares bred with frozen semen

Proc. Am. Assoc. Equine Pract., 1491-1498

Card, C. (2005)

Post-breeding inflammation and endometrial cytology in mares

Theriogenology, 64, 580-588

Cary, W.H. (1943)

A method of obtaining endometrial smears for study of their cellular content

Am. J. Obst. and Gynec., 46, 422

Causey, R.C. (2006)

Making sense of equine uterine infections: the many faces of physiological clearance

Vet. J., 172, 405-421

Causey, R.C. (2007)

Uterine therapy for mares with bacterial infections

In: Samper, J.C., Pycock, J.F., McKinnon, A.O. (Hrsg.): Current Therapy in Equine Reproduction

Saunders, Philadelphia, 105-116

Chen, Y.M.M., Wright, P.J., Lee, S., Browning, G.F. (2003)

Uropathogenic virulence factors in isolates of *Escherichia coli* from clinical cases of canine pyometra and feces of healthy bitches

Vet. Microbiol., 94, 57-69

Collins, S.M. (1964)

A study of the incidence of cervical and uterine infection in thoroughbred mare in ireland

Vet. Rec., 76, 673-675

Conboy, H.S. (1978)

Diagnosis and therapy of equine endometritis

Proc. Am. Assoc. Equine Pract., 165-171

Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., Lappin-Scott, H.M. (1995)

Microbial biofilms

Annu. Rev. Microbiol., 49, 711-745

Couto, M.A., Hughes, J.P. (1984)

Technique and interpretation of cervical and endometrial cytology in the mare

Equine Vet. Sci., 4, 265-273

Literaturverzeichnis

Couto, M.A., Hughes, J.P. (1993)

91. Sexually transmitted (venereal) diseases of horses

In: McKinnon, A.O., Voss, J.L. (Hrsg.): Equine Reproduction, 1. Auflage, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 845-854

Crickman, J.A., Pough, D.G. (1986)

Equine endometrial cytology: A review of techniques and interpretations

Vet. Med., 650-656

Crowhurst, R.C. (1977)

Genital infection in mares

Vet. Rec., 100, 476

Cuervo-Arango, J. (2007)

Early incidence of intraluminal uterine fluid following AI and its relationship with persistent mating-induced endometritis in the mare

Proc. Italian Assoc. Equine Vet., Bologna, 159

Dascanio, J., Ley, W.B., Bowen, J.M. (1997)

How to perform and interpret uterine cytology

Proc. Am. Assoc. Equine Pract., 182-186

Dascanio, J.J., Schweizer, C., Ley, W.B. (2001)

Equine fungal endometritis

Equine Vet. Educ., 13, 324-329

Dascanio, J.J. (2003)

Endometrial cytology

In: Robinson, N.E. (Hrsg.): Current Therapy in Equine Medicine, 5. Auflage,

Saunders, Philadelphia, 226-228

Dimock, W.W., Edwards, P.R. (1927)

Genital infection in mares by an organism of the encapsulatus group

J. Am. Vet. Med. Assoc., 70, 469-480

Dimock, W.W. (1935)

Breeding problems in mares

Cornell. Vet., 25, 165

Dixon, W.J. (1993)

BMDP Statistical Software Manual, Volume 1 and 2

University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London

Domenico, P., Salo, R.J., Cross, A.S. (1994)

Polysaccharide capsule-mediated resistance to opsonophagocytosis in *Klebsiella pneumoniae*

Infect. Immun., 62, 4495-4499

Ehlers, J.P. (2000)

Standardisierung und Reproduzierbarkeit der Vaginalzytologie bei der Hündin und ihr Einsatz bei der Bestimmung des optimalen Belegungszeitraumes

Diss. med. vet., Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Eilts, B.E., Scholl, D.T., Paccamonti, D.L., Causey, R., Klimczak, J.C., Corley, J.R. (1995)

Prevalence of endometrial cysts and their effect on fertility

Biol. Reprod. Mono., 1, 527-532

Emmert, M. (2000)

Endometritis

In: Wiesner, E., Ribbeck, R. (Hrsg.): Lexikon der Veterinärmedizin, 4. Auflage

Enke Verlag, Stuttgart, 413

Evans, M.J., Hamer, J.M., Gason, L.M., Graham, C.S., Asbury, A.C., Irvine, C.H. (1986)

Clearence of bacteria and non-antigenic markers following intra-uterine inoculation into maiden mares

Theriogenology, 26, 37-50

Literaturverzeichnis

Evans, M.J., Hamer, J.M., Gason, L.M., Irvine, C.H. (1987)

Factors affecting uterine clearance of inoculated materials in mares

J. Reprod. Fert., Suppl. 35, 445-454

Farrelly, B.T., Mullaney, P.E. (1964)

Cervical und uterine infection in thoroughbred mares

Irish Vet. J., 18, 201-212

Ferreira, C.D. (1956)

Diagnosis of ovulation by endometrial cytology

Proc. 2nd World Cong. Fertil. and Steril., 1, 525

Ferreira-Dias, G., Nequin, L.G., King, S.S. (1994)

Influence of estrus cycle stage on adhesion of *Streptococcus zooepidemicus* to equine endometrium

Am. J. Vet. Res., 55, 1028-1031

Fiala, S.M., Pimentel, C.A., Mattos, A.L.G., Gregory, R.M., Mattos, R.C. (2007)

Effect of sperm numbers and concentration on sperm transport and uterine inflammatory response in the mare

Theriogenology, 67, 556-562

Freeman, K.-P., Roszel, J.-F., Slusher, S.H. (1986)

Equine endometrial cytologic smear patterns

Compend. Contin. Educ. Practicing Vet., 8, 349-360

Freeman, K.P., Roszel, J.F., Slusher, S.H., Castro, M. (1990)

Variation in glycogen and mucins in the equine uterus related to physiologic and pathologic conditions

Theriogenology, 33, 799-808

Frontoso, R., De Carlo, E., Pasolini, M.P., van der Meulen, K., Pagnini, U., Iovane, G., De Martino, L. (2008)

Retrospective study of bacterial isolates and their antimicrobial susceptibilities in equine uteri during fertility problems

Res. Vet. Sci., 84, 1-6

Ghasemzadeh-nava, H., Ghasemi, F., Tajik, P., Shirazi, A. (2004)

A review of mare endometritis in Iran

Equine Vet. Sci., 24 (5), 188-192

Glenthoj, A., Bostofte, E., Rank, F. (1986)

Brush cytology from the uterine endocervix

Acta Obstet. Gynecol. Scand., 65, 689-691

Handler, J., Aurich, J.E. (2005)

2. Physiologie des Sexualzyklus der Stute

In: Aurich, C. (Hrsg.): Reproduktionsmedizin beim Pferd; Gynäkologie – Andrologie - Geburtshilfe, 1. Auflage, Verlag Parey, Stuttgart, 15-29

Hecht, E.L. (1952)

The value of the endometrial smear in the detection of malignancy

New York J. Med., 52, 2745

Heilkenbrinker, T., Kossin, C., Scherbarth, R., Frerking H. (1997)

Zur Überprüfung geeigneter anamnestischer und klinischer Parameter für eine Abfohlprognose unter Praxisbedingungen

Dtsch. Tierärztl. Wschr., 104, 313-316

Hemberg, E., Lundeheim, N., Einarsson, S. (2005)

Retrospective study on vulvar confirmation in relation to endometrial cytology and fertility in thoroughbred mares

J. Am. Vet. Med. Assoc., 52, 474-477

Literaturverzeichnis

Hinrichs, K., Cummings, M.R., Sertich, P.L., Kenney, R. (1988)
Bacteria recovered from the reproductive tracts of normal mares
Proc. Am. Assoc. Equine Pract., 11-16

Huchzermeyer, S., Wehrend, A., König, A., Bostedt, H. (2002)
Qualitative and quantitative studies on the distribution of the bacterial flora in the genital tract of clinically normal mares
DVG-Proceedings der 35. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung, Leipzig (14.-15. Februar 2002), 121

Huchzermeyer, S. (2003)
Funktionelle und morphologische Studien über die equine Zervix im Stadium der Ingravidität
Diss. med. vet., Justus-Liebig-Universität Gießen

Hughes, J.P., Loy, R.G., Asbury, A.C., Burd, H.E. (1966)
The occurrence of *Pseudomonas* in the reproductive tract of mares and its effect on fertility
Cornell. Vet., 56, 595-610

Hughes, J.P., Loy, R.G. (1969)
Investigations on the effect on intrauterine inoculation of *Streptococcus zooepidemicus* in the mare
Proc. Am. Assoc. Equine Pract., 15, 289-292

Hughes, J.P. (1980)
Clinical examination and abnormalities in the mare
In: Morrow, D.A. (Hrsg.): Current Therapy in Theriogenology
Saunders, Philadelphia, 706-721

Hurtgen, J.P. (2006)
Pathogenesis and treatment of endometritis in the mare: A review
Theriogenology, 66, 560-566

Hüthwohl, H., Weiss, R., Schmeer, N., Schliesser, T. (1989)

Zu Vorkommen und Bedeutung plasmakoagulasenegativer Staphylokokken aus dem Genitaltrakt von Pferden

Dtsch. Tierärztl. Wschr., 96, 256-258

Inoue, Y., Ito, K., Terade, T., Nishimura, N., Hatazoe, T., Soto, K. (2000)

Degenerative changes in the endometrial vasculature of the mare detected by videoendoscopic examination

Proc. Am. Assoc. Equine Pract., 325-329

Jonsson, H., Lindmark, H., Guss, B. (1995)

A protein G-related cell surface protein in *Streptococcus zooepidemicus*

Infect. Immun., 63, 2968-2975

Kasimanickam, R., Leslie, K., Duffield, T., Gartley, C., Johnson, W. (1999)

A comparison of the cytobrush and uterine lavage technique to evaluate endometrial cytology in postpartum dairy cows

Proc. 32th Ann. Meet. Soc. for Theriogenology, Nashville, Tennessee, 22.-24. Sept., 1999, 6

Kasimanickam, R., Duffield, T.F., Foster, R.A., Gartly, C.J., Leslie, K.E., Walton, J.S. (2004)

Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows

Theriogenology, 62, 9-23

Kasimanickam, R., Duffield, T.F., Foster, R.A., Gartly, C.J., Leslie, K.E., Walton, J.S. (2005)

A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows

Can. Vet. J., 46, 255-259

Literaturverzeichnis

Kaspar, B., Kähn, W., Laging, C., Leidl, W. (1987)

Endometriumszysten bei Stuten, Teil 1, Post-mortem-Untersuchungen: Vorkommen und Morphologie

Tierärztl. Praxis, 15, 161-166

Katila, T. (1995)

Onset and duration of uterine inflammatory response of mares after insemination with fresh semen

Biol. Reprod. Mono., 1, 515-517

Katila, T. (1996)

Uterine defence mechanisms in the mare

Anim. Reprod. Sci., 42, 197-204

Katila, T. (2005)

Effect of the inseminate and site of insemination on the uterus and pregnancy rates of mares

Anim. Reprod. Sci., 89, 31-38

Kenney, R.M. (1978)

Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death

J. Am. Vet. Med. Assoc., 172, 241-262

Kenney, R.M., Doig, P.A. (1986)

Equine endometrial biopsy

In: Morrow, D.A (Hrsg.): Current Therapy in Theriogenology, Bd. 2

Saunders, Philadelphia, 723-729

King, S.S., Young, D.A., Nequin L.G., Carnevale, E.M. (2000)

Use of specific sugars to inhibit bacterial adherence to equine endometrium in vitro

Am. J. Vet. Res., 61, 446-449

Klein, C., Huchzermeyer, S., Wehrend, A. (2006)

The function of the hymenal area and the cervix as microbiological barrier in the mare
Reprod. Dom. Anim. 41, Suppl. 1, 18

Klein, C., Lottner, S., Huchzermeyer, S., Weiss, R., Wehrend, A. (2009)

Untersuchungen zur mikrobiellen Barrierefunktion des Hymenalrings und der Zervix
bei der Stute

Tierärztl. Praxis, 37, 113-117

Klug, E., Sieme, H. (1992)

Infectious agents in equine semen

Acta Vet. Scand., Suppl. 88, 73-81

Knudsen, O. (1964)

Endometrial cytology as a diagnostic aid in mares

Cornell. Vet., 54, 415-422

Knudsen, O. (1982)

A combined cytologic and bacteriologic endometrial examination in the mare

Proc. Am. Assoc. Equine Pract., 431-433

Koskinen, E., Katila, T. (1987)

Uterine involution, ovarian activity and fertility in the post-partum mare

J. Reprod. Fert., Suppl. 35, 733-734

Kotilainen, T., Muhtinen, M., Katila, T. (1994)

Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus

Theriogenology, 41, 629-636

LaCour, A., Sprinkle, T.A. (1985)

Relationship of endometrial cytology and fertility in the broodmare

Equine Pract., 7, 28-32

Literaturverzeichnis

Langoni, H., Alvarenga, M.A., Papa, F.O., Sakamoto, C., Baldini, S., Listoni, F.J. (1997)

Aerobic, microaerobic and anaerobic bacteria in equine endometritis
Pferdeheilkunde, 13, 548

Lauer, J. (1977)

Die klinische Zytodiagnostik zur Verifizierung symptomarmer Genitalinfektionen bei der Stute

Diss. med. vet., Justus-Liebig-Universität Gießen

Le Blanc, M.M., Neuwirth, L., Asbury, A.C., Tarn, T., Mauragis, D., Klapstein, E. (1994a)

Scintigraphic measurement of uterine clearance in normal mares and mares with recurrent endometritis

Equine Vet. J., 26, 109-113

LeBlanc, M.M., Neuwirth, L., Mauragis, D., Klapstein, E., Tran, T. (1994b)

Oxytocin enhances clearance of radiocolloid from the uterine lumen of reproductively normal mares and mares susceptible to endometritis

Equine Vet. J., 26, 279-282

LeBlanc, M.M., Johnson, R.D., Calderwood Mays, M.B., Valderrama, C. (1995)

Lymphatic clearance of Indiaink in reproductively normal mares and mares susceptible to endometritis

Biol. Reprod. Mono., 1, 501-506

Le Blanc, J.J. (1997)

The equine endometrium and the pathophysiology of endometritis

Proc. Reprod. Pathol., 78-84

LeBlanc, M.M., Neuwirth, L., Jones, L., Cage, C., Mauragis, D. (1998)

Differences in uterine position of reproductively normal mares and those with delayed uterine clearance detected by scintigraphy

Theriogenology, 50, 49-54

LeBlanc, M.M., Magsig, J., Stromberg, A.J. (2007)

Use of a low-volume uterine flush for diagnosing endometritis in chronically infertile mares

Theriogenology, 68, 403-412

LeBlanc, M.M. (2008)

When to refer an infertile mare to a theriogenologist

Theriogenology, 70, 3, 421-429

Leidl, W., Kaspar, B., Kähn, W. (1987)

Endometriumszysten bei Stuten, Teil 2, Klinische Untersuchungen: Vorkommen und Bedeutung

Tierärztl. Praxis, 15, 281-289

Ley, W.B. (1986)

Additional tips for endometrial cytology in mares

Vet. Med., 81, 894

Lindmark, H., Jacobsson, K., Frykberg, L., Guss, B. (1996)

Fibronectin-binding protein of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*

Infect. Immun., 64, 3993-3999

Liu, I.K. (1988)

Uterine defence mechanisms in the mare

Vet. Clin. North Am. Large Anim. Pract., 4, 221-228

Liu, I.K., Troedsson, M.H. (2008)

The diagnosis and treatment of endometritis in the mare: Yesterday and today

Theriogenology, 70, 415-420

Lyle, S.K., Asbury, A.C., Boyle, M.D., Reis, K.J., Roudebush, B.A. (1991)

Pathogenesis of equine endometritis: proposed interaction between streptococcal immunoglobulin-binding proteins and other uterine pathogens

J. Reprod. Fert., Suppl. 44, 741

Literaturverzeichnis

Malschitzky, E., Schilela, A., Mattos, A., Garbade, P., Gregory, R., Mattos, R.C. (2003)

Intrauterine fluid accumulation during foal heat increases embryonic death
Pferdeheilkunde, 19, 246-249

Mattos, R.C., Mattos, L.G., Günzel, A.R., Klug, E. (1984)

Bakteriologische und zytologische Untersuchungen von Uterusabstrichen beim Pferd
Prakt. Tierarzt, 10, 809-814

McCue, P.M., Hughes, J.P. (1990)

The effect of postpartum uterine lavage on foal heat pregnancy rate
Theriogenology, 33, 1121-1129

McKinnon, A.O., Squires, E.L., Harrison, L.A., Blach, E.L., Shideler, R.K. (1988)

Ultrasonographic studies on the reproductive tract of mares after parturition: Effect of involution and uterine fluid on pregnancy rates in mares with normal and delayed first postpartum ovulatory cycles
J. Am. Vet. Med. Assoc., 192, 350-353

McKoy, H.E., Broder, C.C., Lottenberg, R. (1991)

Streptokinases produced by pathogenic group C streptococci demonstrate species-specific plasminogen activation
J. Infect. Dis., 164, 515-521

Merkt, H., von Lepel, J. (1970)

Die Entnahme von Proben für die bakteriologische Untersuchung des Genitalsekretes der Stute, ihre Beurteilung sowie Behandlungshinweise
Dtsch. Tierärztl. Wschr., 77, 518-521

Merkt, H., Klug, E., Günzel, A.-R. (1980a)

Control of equine venereal diseases, Klebsiella and Pseudomonas
In: Proceedings of the international symposium on equine venereal diseases
UK: Animal Health Trust, 50-53

Merkt, H., Bisping, W., Günzel, A.-R. (1980b)

Die Tupferprobe in der gynäkologischen Untersuchung der Stute

Prakt. Tierarzt, 4, 301-308

Merkt, H., Wöckener, A., Heilkenbrinker, T., Zemke, M., Wittenbrink, M.M., Bisping, W. (1987)

Mikrobielle Untersuchung in der Stutengynäkologie

Prakt. Tierarzt, 3, 5-12

Møller Nielsen, J. (2005)

Endometritis in the mare: a diagnostic study comparing cultures from swab and biopsy

Theriogenology, 64, 510-518

Neely, D.P., Kindahl, H., Stabenfeldt, G.H., Edquist, L.E., Hughes, J.P. (1979)

Prostaglandin release patterns in the mare: Physiological, pathophysiological, and therapeutic responses

J. Reprod. Fert., Suppl. 27, 181-189

Newcombe, J.R. (1978)

The bacterial flora of the genital organs of the mare

Vet. Rec., 102, 169-170

Newcombe, J.R. (1998)

Understanding the causes, significance and treatment of intra-luminal uterine fluid

Equine Vet. Sci., 18, 74-78

Nikolakopoulos, E., Watson, E.D. (1999)

Uterine contractility is necessary for the clearance of intrauterine fluid but not bacteria after bacterial infusion in the mare

Theriogenology, 52, 413-423

Literaturverzeichnis

Nikolakopoulos, E., Watson, E.D. (2000)

Effect of infusion volume and sperm numbers on persistence of uterine inflammation in mares

Equine Vet. J., 32, 164-166

Nikolakopoulos, E., Kindahl, H., Watson, E.D. (2000)

Oxytocin and PGF_{2α} release in mares resistant and susceptible to persistent mating-induced endometritis

J. Reprod. Fert., 56, 363-372

Pansegrau, U. (2007)

Klinische Untersuchung zur prospektiven Klassifizierung subfertiler Stuten

Diss. med. vet., Tierärztliche Hochschule Hannover

Pansegrau, U., Meinecke-Tillmann, S., Swagemakers, J.H., Meinecke, B. (2008)

Effect of oxytocin and seminal plasma treatment on uterine contractile activity and pregnancy rates in subfertile mares

Pferdeheilkunde, 24, 227-235

Parkins, M.D., Ceri, H., Storey, D.G. (2001)

Pseudomonas aeruginosa GacA, a factor in multihost virulence, is also essential for biofilm formation

Mol. Microbiol., 40, 1215-1226

Peterson, F.B., McFeely, R.A., David, J.S.E. (1969)

Studies on the pathogenesis of endometritis in the mare

Proc. Am. Assoc. Equine Pract., 279-287

Platt, H., Atherton, J.G., Orskov, I. (1976)

Klebsiella and Enterobacter organisms isolated from horses

J. Hyg. Camb., 77, 41-44

Pohl, R., Wagenseil, F., Hünermund, G., Romer, H. (1977)

Die zytologische Untersuchung von Zervix-Tupferproben als diagnostisches Hilfsmittel bei der gynäkologischen Untersuchung und zuchthygienischen Beurteilung von Stuten

Tierärztl. Umschau, 12, 634-640

Purswell, B.J., Ley, W.B., Sriranganathan, N., Bowen, J.M. (1989)

Aerobic and anaerobic bacterial flora in the postpartum mare

Equine Vet. Sci., 9 (3), 141-143

Pycock, J.F., Allen, W.E. (1989)

Die frühzeitige chemotaktische Reaktion des equinen Uterus auf akute Entzündungsreize

Tierärztl. Praxis, Suppl. 4, 17-20

Pycock, J.F., Allen, W.E., Newcombe, J.R. (1989)

Use of real-time ultrasonography to detect uterine pathology in the mare

British J. Radiology, 61, 551-552

Pycock, J.F., Allen, W.E. (1990)

Inflammatory components in uterine fluid from mares with experimentally induced bacterial endometritis

Equine Vet. J., 22, 422-425

Pycock, J.F., Newcombe, J.R. (1996a)

Relationship between intraluminal uterine fluid, endometritis and pregnancy rates in the mare

Equine Pract., 18, 19-22

Pycock, J.F., Newcombe, J.R. (1996b)

Assesment of the effect of three treatments to remove intrauterine fluid on pregnancy rate in the mare

Vet. Rec., 138, 320-323

Literaturverzeichnis

Pycock, J.F. (2006)

How to maximize the chances of breeding successfully from the older maiden mare
Proc. Am. Assoc. Equine Pract., 52, 245-249

Pycock, J.F. (2007)

Therapy for mares with uterine fluid

In: Samper, J.C., Pycock, J.F., McKinnon, A.O. (Hrsg.): Current Therapy in Equine
Reproduction

Saunders, Philadelphia, 93-104

Raab, D. (2004)

Evaluierung der Cytobrush-Methode zur Diagnostik von subklinischen
Endometritiden und Auswirkungen der Entzündung auf die folgende
Fruchtbarkeitsleistung von Milchkühen

Diss. med. vet., Freie Universität Berlin

Rasch, K., Schoon, H.A., Sieme, H., Klug, E. (1996)

Histomorphological endometrial status and influence of oxytocin on the uterine
drainage and pregnancy rate in mares

Vet. Rec., 28, 455-460

Reilas, T., Katila, T., Mäkela, O., Huhtinen, M., Koskinen, E. (1997)

Intrauterine fluid accumulation in oestrus mares

Acta Vet. Scand., 38, 69-78

Reinemund, B. (1988)

Vergleichende Untersuchungen zur Klinik, Zytologie, Bakteriologie und Histologie der
Endometritis bei der Stute unter Berücksichtigung parenteraler und intrauteriner
Behandlungsverfahren

Diss. med. vet., Justus-Liebig-Universität Gießen

Ricketts, S.W., Rossdale, P.D., Wingfield Digby, N.J., Falk, N.M., Hopes, R., Hunt, M.D., Peace, C.K. (1977)

Genital infections in mares

Vet. Rec., 101, 65

Ricketts, S.W. (1978)

Histological and histopathological studies of the endometrium of the mare

Fellowship thesis, Royal College of Veterinary Surgeons

Ricketts, S.W. (1981)

Bacteriological examinations of the mare's cervix. Techniques and interpretation of results

Vet. Rec., 108, 46-51

Ricketts, S.W., Wingfield Digby, N.J. (1982)

Endometrial cytology

J. Reprod. Fert., Suppl. 32, 638-639

Ricketts, S.W., Mackintosh, M.E. (1987)

Role of anaerobic bacteria in equine endometritis

J. Reprod. Fert., Suppl. 35, 343-351

Riddle, W.T., LeBlanc, M.M., Stromberg, A.J. (2007)

Relationship between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a thoroughbred practice

Theriogenology, 68, 395-402

Rigby, S.L., Barhoumi, R., Burghardt, R.C., Colleran, P., Thompson, J.A., Varner, D.D., Blanchard, T.L., Brinsko, S.P., Taylor, T., Wilkerson, M.K., Delp, M.D. (2001)

Mares with delayed uterine clearance have an intrinsic defect in myometrial function

Biol. Reprod., 65, 740-747

Literaturverzeichnis

Romberg, G.H. (1954)

Endometrial aspiration smears in the study of infertility

Fertil. Steril., 5, 52-67

Roszel, J.-F., Freeman, K.-P. (1988)

Equine endometrial cytology

Vet. Clin. North Am. Equine Pract., 4, 247-262

Saltiel, A., Gutierrez, A., de Buen-Lladol, N., Sosa, C. (1987)

Cervico-endometrial cytology and physiological aspects of the post-partum mare

J. Reprod. Fert., Suppl. 35, 305-309

Schilela, A., Malschitzky, E., Mattos, A., Garbade, P., Gregory, R.M., Mattos, R.C. (2001)

Effect of an intra-uterine fluid accumulation before and after the first postpartum ovulation on pregnancy rates in the mare

Pferdeheilkunde, 17, 639-643

Schmidt, A.R. (1988)

Guarded right uterine horn lavage in the mare for bacteriology and cytology

Diss med. vet., Michigan State University, East Lansing

Schoon, H.A., Schoon, D., Kötter, B., Runge, A., Klug, E. (1993)

Zur Diagnose, Pathogenese und Bedeutung endometrialer Zysten bei der Stute

Pferdeheilkunde, 9, 215-221

Schoon, H.A., Schoon, D. (1995)

Das Endometrium der Stute – ein Hochleistungsorgan, Störungen und Verschleißerscheinungen

Vortragzusammenfassung BPT Kongreß, Braunschweig, 51-53

Scott, P., Daley, P., Baird, G., Sturgess, S., Frost, A. (1971)

The aerobic bacterial flora of the reproductive tract of the mare

Vet. Rec., 88, 58-61

Shin, S.J., Lein, D.H., Aronson, A.L., Nusbaum, S.R. (1979)

The bacteriological culture of equine uterine contents, in-vitro sensitivity of organisms isolated and interpretation

J. Reprod. Fert., Suppl. 27, 307-315

Slusher, S.H., Freeman, K.-P., Roszel, J.-F. (1984)

Eosinophils in equine uterine cytology and histology specimens

J. Am. Vet. Med. Assoc., 184, 665-670

Solomon, W.J., Schultz, R.H., Fahning, M.L. (1972)

A study of chronic infertility in the mare utilizing uterine biopsy, cytology and cultural methods

Proc. Am. Assoc. Equine Pract., 55-68

Smith, D.M., El Sahwi, S., Wilson, N., Moyer, D.L. (1971)

Effects of polymorphonuclear lymphocytes on the development of mouse embryos cultured from two- cell stage to blastocysts

Biol. Reprod., 4, 74-83

Stout, T.A.E. (2008)

Fungal endometritis in the mare

Pferdeheilkunde, 24, 83-87

Squires, E.L., Barnes, C.K., Rowley, H.S., McKinnon, A.O., Pickett, B.W., Shideler, R.K. (1989)

Effect of uterine fluid and volume of extender on fertility

Proc. Am. Assoc. Equine Pract., 25-30

Tammer, I., Blendinger, K., Sobiraj, A., Bostedt, H. (1994)

Über den Einsatz der exfoliativen Vaginalzytologie im Rahmen der gynäkologischen Befunderhebung bei der Hündin

Tierärztl. Praxis, 22, 199-207

Literaturverzeichnis

Tillmann, H., Lauer, J. (1977)

Die Zelldiagnostik bei symptomarmen Entzündungen der Genitalschleimhäute der Stute

Tierärztl. Umschau, 7, 376-379

Tillmann, H., Meinecke, B. (1980)

Die zytodiagnostische Interpretation der lokalen Abwehrreaktionen bei Genitalinfektionen der Stute

Tierärztl. Praxis, 8, 211-222

Tillmann, H., Meinecke, B. (1982)

Klinische Aspekte der Genitalinfektionen beim Pferd

7. Veterinär-Humanmedizinische Tagung, Gießen, 157-158

Tillmann, H., Meinecke, B., Weiss, R. (1982)

Genitalinfektionen beim Pferd

Tierärztl. Praxis, 10, 91-114

Timoney, P.J. (1996)

Contagious equine metritis

Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., 19, 199-204

Timoney, J.F., Mukhtar, M.M. (1993)

The protective M proteins of the equine group C streptococci

Vet. Microbiol., 37, 389-195

Traub-Dargatz, J.L., Salman, M.D., Voss, J.L. (1991)

Medical problems of adult horses, as ranked by equine practitioners

J. Am. Vet. Med. Assoc., 198, 1745-1747

Trimbos, J.B., Arentz, N.P. (1985)

The efficiency of the cytobrush versus the cotton swab in the collection of endocervical cells in cervical smears

Acta Cytol., 261-263

Troedsson, M.H. (1991a)

Uterine defense mechanisms in the mare

Ph.D. Thesis, University of California, Davis, USA

Troedsson, M.H., Liu, I.K. (1991b)

Uterine clearance of non-antigenic markers (51Cr) in response to a bacterial challenge in mares potentially susceptible and resistant to chronic uterine infection

J. Reprod. Fert., Suppl. 44, 283-288

Troedsson, M.H., deMoraes, M.J., Liu, I.K. (1993a)

Correlations between histologic endometrial lesions in mares and clinical response to intrauterine exposure to *Streptococcus zooepidemicus*

Am. J. Vet. Res., 54, 570-572

Troedsson, M.H., Liu, I.K., Ing, M., Pascoe, J., Thurmond, M. (1993b)

Multiple site electromyography recordings of uterine activity following intrauterine bacterial challenge in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection

J. Reprod. Fertil., 99, 307-313

Troedsson, M.H., Scott, M.A., Liu, I.K. (1995a)

Comparative treatment of mares susceptible to chronic uterine infection

Am. J. Vet. Res., 56, 468-472

Troedsson, M.H., Steiger, B.N., Ibrahim, N.M., Foster, D.N., Crabo, B.G. (1995b)

Mechanisms of sperm induced endometritis in the mare

Biol. Reprod., 52, Suppl. 1, 307

Troedsson, M.H. (1997)

Diseases of the uterus

In: Robinson, N. (Hrsg.): Current Therapy in Equine Medicine 4

Saunders, Philadelphia, 517-524

Literaturverzeichnis

Troedsson, M.H., Liu, I.K., Crabo, B.G. (1998)

Sperm transport and survival in the mare: A review

Theriogenology, 50, 807-818

Troedsson, M.H. (1999)

Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare

Theriogenology, 52, 461-471

Troedsson, M.H.T., Loset, K., Alghamdi, A.M., Dahms, B., Crabo, B.G. (2001)

Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen

Anim. Reprod. Sci., 94, 270-273

Troedsson, M.H., Desvougges, A., Macpherson, M.L., Pozor, M. (2008)

Persistent breeding-induced endometritis

Pferdeheilkunde, 24, 56-60

Van Camp, S.D. (1986)

Breeding soundness evaluation of the mare and common abnormalities encountered

In: In Morrow, D.A. (Hrsg.): Current Therapy in Theriogenology

Saunders, Philadelphia, 654-661

Waelchi, R.O., Corboz, L., Winder, N.C. (1988)

Comparison of histological, cytological and bacteriological findings in the endometrium of the mare

J. Vet. Med. A., 35, 442-449

Waelchi, R.O., Känzig, M., Gygax, A., Corboz, L., Rüschi, P. (1993)

The relationship between cycle stage and results of uterine culture in the mare

J. Vet. Med. A., 40, 569-575

Waites, G.T., Bell, S.C. (1982)

Glycogen-induced intrauterine leukocytosis and its effect on mouse blastocysts implantation in vivo and in vitro

J. Reprod. Fert., 66, 563-569

Walker, J.A., Timoney, J.F. (1998)

Molecular basis of variation in protective SzP proteins of *Streptococcus zooepidemicus*

Am. J. Vet. Res., 59, 1129-1133

Walter, J. (2006)

Untersuchungen zur zyklusabhängigen funktionellen Morphologie der equinen Zervix
Diss. med. vet., Justus-Liebig-Universität Gießen

Walter, J., Klein, C., Wehrend, A. (2006)

Usability of the Eosin-Thiazin staining method in exfoliative endometrial cytology of mares

Reprod. Dom. Anim., 41, Suppl. 1, 39

Walter, J., Wehrend, A. (2007)

Einsatz der exfoliativen Endometriumszytologie im Rahmen der gynäkologischen Untersuchung von Zuchtstuten

Pferdeheilkunde, 23, 481-488

Walter, J. (2009)

Aspekte der gynäkologischen Untersuchung

Tagungsbeitrag ATF-Fortbildung: Vorbereitung auf die Pferdezuchtsaison 2009, Gießen (24.1.2009), 27

Walter, J., Wehrend, A. (2009)

Anfertigung und Interpretation exfoliativer Endometriumszytologien bei der Zuchtstute
Tierärztl. Praxis, im Druck

Literaturverzeichnis

Washburn, S.M., Lesius, P.H., Ganjam, V.K., Brown, B.G. (1982)
Effect of estrogen and progesterone on the phagocytic response of ovariectomized mares infected in utero with *β -hemolytic streptococci*
Am. J. Vet. Res., 43, 1367-1370

Watson, E.D. (1988)
Uterine defence mechanisms in mares resistant and susceptible to persistent endometritis: A review
Equine Vet. J., 20, 397-400

Watson, E.D. (2000)
Post- breeding endometritis in the mare
Anim. Reprod. Sci., 60-61, 221-232

Wehrend, A., Huchzermeyer, S., Reinemund, B. (2004)
Investigations on the suitability of intracervical and intrauterine sampling for bacteriological investigations and cytological assessment in mares
Wiener Tierärztl. Monatsschr., 91, Suppl. 2, 72

Wehrend, A., Walter, J., Bostedt, H. (2006)
Tupferprobenentnahme zur bakteriologischen Untersuchung und exfoliativen Zytologie aus dem Uterus der Zuchtstute
19. Arbeitstagung der Fachgruppe Pferdekrankheiten der DVG am 10.-11.2.2006, Hannover

Williamson, P., Dunning, A., O'Connor, J., Penhale, W.J. (1983)
Immunoglobulin levels, proteins concentration and alkaline phosphatase activity in uterine flushings from mares with endometritis
Theriogenology, 19, 441-449

Wilson, G.L. (1985)
Hysteroscopic examination of mares
Vet. Med., 80, 59-63

Wingfield Digby, N.J. (1978)

The technique and clinical application of endometrial cytology in mares

Equine Vet. J., 10, 167-170

Wingfield Digby, N.J., Ricketts, S.W. (1982)

Results of concurrent bacteriological and cytological examinations of the endometrium of mares in routine stud farm practice 1978-1981

J. Reprod. Fert., Suppl. 32, 181-185

Witherspoon, D.M., Goldston, R.T., Adsit, M.E. (1972)

Uterine culture and biopsy in the mare

J. Am. Vet. Med. Assoc., 161, 1365

Wittenbrink, M.M., Hoelzle, K., Hoelzle, L.E. (2008)

What´s new in bacteriology of the mare´s genital tract

Pferdeheilkunde, 24, 53-55

Woolcock, J.B. (1980)

Equine bacterial endometritis: Diagnosis, interpretation, and treatment

Vet. Clin. North Am. Large Anim. Pract., 2, 241-251

Zafracas, A.M. (1975)

Candida infection of the genital tract in thoroughbred mares

J. Reprod. Fert., Supplement 23, 349-351

Zent, W.W., Troedsson, M.H. (1998)

Post breeding uterine fluid accumulation in a normal population of thoroughbred mares: a field study

Proc. Am. Assoc. Equine Pract., 44, 64-65

Danksagung

Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. A. Wehrend für die Überlassung des interessanten Themas, das entgegengebrachte Vertrauen sowie für die ständige Motivation zu selbstständigem und zügigen Arbeiten. Vor allem möchte ich mich für die jederzeit umgehend durchgeführten Korrekturen bedanken, die einen großen Anteil am steten Voranschreiten dieser Arbeit haben.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Jasmin Walter vom Gestüt Birkhof, meiner „Co-Betreuerin“, für die tolle Unterstützung während aller Phasen der Dissertation, insbesondere aber für die Hilfestellung in den ersten Monaten, um aus einem wissenschaftlichen „Greenhorn“ einen zielstrebigen Doktoranden zu formen. Außerdem für die geduldige klinische Ausbildung. Lediglich den Spruch: „Was machst du hier unten? Ab zum Schreiben aufs Zimmer!“ werde ich wenig vermissen. Danke!!!

Großer Dank gebührt der gesamten Familie Casper sowie allen ihren Mitarbeitern vom Gestüt Birkhof für die Möglichkeit, den praktischen Teil auf ihrem Gestüt durchführen zu können. Die Aufnahme, die Unterstützung und das Miteinander waren außergewöhnlich positiv und herzlich und werden mir immer in besonderer Erinnerung bleiben.

Vielen Dank an Dr. K. Failing und Frau Sparrenberg von der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung für ihre Mithilfe bei der statistischen Auswertung meiner Untersuchungsergebnisse.

Ein herzliches Dankeschön an meine Mitstreiter in Gießen Dina, Gesa und Katharina für die vielen Tipps, die den Alltag eines Doktoranden sehr erleichtern, sowie die exzellente Getränke-Versorgung.

Ebenso möchte ich mich bei Katrin für ihre großartige moralische Unterstützung bedanken, der es zu verdanken ist, dass zahlreiche kleine Rückschläge niemals in einer größeren Krise endeten.

Meinen Eltern danke ich für ihre immer währende einzigartige Unterstützung in allen Bereichen, die es mir ermöglicht, ohne Sorge und mit dem Wissen, dass immer alles gut wird, jede Aufgabe anzugehen. Danke für alles!!

Danksagung

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

ISBN 3-8359-5487-3

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de



9 783595 548738