Universität Zürich[UZH]

Klinik für Reproduktionsmedizin

Universität Zürich
Klinik für Reproduktionsmedizin
Winterthurerstrasse 260
CH-8057 Zürich
Telefon +41 44 635 82 41
Telefax +41 44 635 89 40
www.fortpflanzung.uzh.ch

UZH, Klinik für Reproduktionsmedizin
Winterthurerstrasse 260, CH-8057 Zürich

Prof. Dr. med. vet. Iris Margaret Reichler
Abteilungsleiterin Kleintierreproduktion
Telefon +41 44 635 82 66
Telefax +41 44 635 89 40
ireichler@vetclinics.uzh.ch

Albert-Heim-Stiftung
z.Hd. v. Isabel Bänziger
Clavadelerstrasse 12

CH-7272 Davos Clavaxdel

Zürich, 2. März 2023

Abschlussbericht Brachyzephalie

Sehr geehrte Damen und Herren

Gerne sende ich Ihnen im Anhang unseren Abschlussbericht zu unserem Forschungsprojekt „Erkennt man Hunde, die in der Vergangenheit Atemnot hatten, mittels Bluttests? Etablierung eines Screening-Tests für brachyzephale Hunde zur Ausstellungs- und Zuchtzulassung“.
Ziel war, dass wir anhand ihrer Blutwerte nicht oder nur leicht vom obstruktiven Atemnotsyndrom betroffene brachyzephale Hunde (BOASΘ) von mittelgradig und schwer betroffenen Hunden (BOAS⊕) unterscheiden können. Dazu haben wir uns auf Blutwerte fokussiert, welche die Atemfunktion widerspiegeln könnten und welche in der Vorgängerstudie die Differenzierung zwischen brachyzephalen und nicht brachyzephalen Hunden ermöglicht hatte. Diese Blutwerte wurden in der von Ihnen unterstützten Studie auf ihre Eignung als Screeningparameter bei nicht, leicht, mittelgradig oder schwer betroffenen französischen Bulldoggen untersucht.

Deutlich unterschied sich MCH, der mittlere zelluläre Hämoglobingehalt in den roten Blutkörperchen zwischen den nicht oder nur wenig betroffenen (BOASΘ) und den stärker betroffenen Hunden (BOAS⊕). Dies könnte, wie bei intermittierender Hypoxie bekannt, eine physiologische Anpassung an die intermittierend unter Belastung auftretende Hypoxie [1] sein. Diese ist Folge der veränderten Anatomie brachyzephaler Hunde. Möglich wäre aber auch, dass dies bereits die Folge einer

ACCREDITED BY EAEVE/FVE
Universität Bern | Universität Zürich
vetsuisse-fakultät

genetischen Adaptation der französischen Bulldogge an das Leben unter hypoxischen Bedingungen darstellt- ganz ähnlich wie bei menschlichen Populationen, die seit Jahrhunderten in extremen Höhenlagen leben. [2]

Leider ist unseres Erachtens die Bestimmung des MCHs als Screeningtest momentan nicht ausreichend. Die an unseren 84 Hunden ermittelte diagnostische Genauigkeit des MCH- Grenzwertes ist nicht so hoch, als dass wir diesen als alleiniges Differenzierungsmerkmal für die Unterscheidung empfehlen würden. Erfreulicherweise hat jedoch die Schulung von Tierärzten für den auch von uns angewendeten «Trotting Test» zur Differenzierung von BOAS⊕ und BOASΘ bereits begonnen, so dass unsere Ergebnisse in Zukunft vielleicht in Kombination oder auch in fraglichen Fällen eingesetzt werden könnten und zudem bald deutlich mehr potentielle Probanden für die Testevaluation zur Verfügung stehen werden.

Wir sind sehr dankbar, dass Sie uns unterstützt haben, damit konnten wir einen Teil der Untersuchungen finanzieren. Unser erstes Manuskript wurde bereits eingereicht, die zweite Veröffentlichung, zu der Sie massgeblich beigetragen haben, folgt voraussichtlich im Juli dieses Jahres.

Wir bitten Sie die Ergebnisse von L. Reich, S. Kämpf und C. Schmid noch vertraulich zu behandeln, da sie noch nicht publiziert sind und beim zweiten Teil der Studie zudem eine Überprüfung der Datenauswertung noch ansteht. Bitte denken Sie an unsere fleissigen Dissertanten – erst die Publikation der Ergebnisse in einem peer-reviewed paper sichert ihnen ihren Doktortitel.

Mit freundlichen Grüssen und einem herzlichen Dankeschön für Ihre Unterstützung

Im Namen des ganzen Forscherteams

Prof. Dr. med. vet. Iris M. Reichler

Prof. Dr. rer. Nat. Anna Y. Bogdanova

Referenzen
1. Kılıç T. ŞM, Üstünova S., Kılıç A., Daşkaya H., Yıldız Özer A: The effects of therapeutic intermittent hypoxia implementation on complete blood count parameters: An experimental animal model. CLINICAL AND EXPERIMENTAL HEALTH SCIENCES 2022.
2. Bai J, Li L, Li Y, Zhang L: Genetic and immune changes in tibetan high-altitude populations contribute to biological adaptation to hypoxia. Environ Health Prev Med 2022: 27:39.

Anlage: Abschlussbericht

Universität Zürich[UZH]

Klinik für Reproduktionsmedizin

Universität Zürich
Klinik für Reproduktionsmedizin
Winterthurerstrasse 260
CH-8057 Zürich
Telefon +41 44 635 82 41
Telefax +41 44 635 89 40
www.fortpflanzung.uzh.ch

AHS Projekt Nr. 156

Abschlussbericht

„Erkennt man Hunde, die in der Vergangenheit Atemnot hatten, mittels Bluttests? Etablierung eines Screening-Tests für brachyzephale Hunde zur Ausstellungs- und Zuchtzulassung“

Einleitung:

Brachyzephale (kurzschädelige) Hunderassen erfreuen sich stetig wachsender Popularität, so belegen sie derzeit in der Schweiz mit dem Chihuahua und der Französischen Bulldogge Platz eins und fünf der beliebtesten Hunderassen. Die Zunahmen sind mit 25% bzw. 89% seit 2016 im Vergleich zur Gesamtzunahme von Hunden in der Schweiz in diesem Zeitraum mit 12% deutlich überproportional[1] und dies, obwohl Medienkampagnen von Tierschützern und Tierärzten die Qualzuchtproblematik mit den Folgen einer Vielzahl von gesundheitlichen Problemen dieser Hunde aufzeigt und anprangert. [2-35] Diese widerspiegelt sich auch in der im Mittel um rund 2 Jahre kürzeren Lebenserwartung brachyzephaler Hunde. Von den fünfzig häufigsten Hunderassen in der Schweiz zeigte die französische Bulldogge mit lediglich 7.7 Jahre die geringste Lebenserwartung, am ältesten wurde der ungefähr gleichgrosse West Highland White Terrier mit 13.89 Jahren. [1] Die niedrigere Lebenserwartung ist unter anderem durch eine hohe Frühsterblichkeit bedingt. [1] Erkrankungsprädispositionen bestehen u.a. für verschiedene neurologische, dermatologische, gastrointestinale sowie ophthalmologische Erkrankungen. Am häufigsten ist das brachyzephale obstruktive Atemwegssyndrom (BOAS) [36], deutlich erkennbar durch die angestrengte Atmung begleitet von lauten Atemgeräuschen unter Belastung, in stärker betroffenen Hunden aber auch in Ruhe und im Schlaf. [37] Erstickungsanfälle sind häufig, da Hunde mit BOAS hochgradig stress- und belastungsintolerant sind.[6; 7; 21; 38; 39] insbesondere bei wärmeren Umgebungstemperaturen. Der Vergleich mit nicht brachycephalen Hunden zeigt ihre

ACCREDITED BY EAEVE/FVE
Universität Bern | Universität Zürich
vetsuisse-fakultät

schwerwiegende Hitzeintoleranz anhand ihrer höheren Sterberate in den Sommermonaten. [1]

Um das mit der Brachyzephalie einhergehende Tierleiden zu vermeiden, wurde eine Arbeitsgruppe an der Vetsuisse-Fakultät gebildet. Initiiert wurde dies durch den Schweizer Tierschutz, nachdem uns bereits Vertreter des Schweizerischen Klubs für Französische Bulldoggen kontaktiert hatten. Mittlerweile sind wir ein großes Team bestehend u.a. aus Physiologen, Klinikern, Tierschutzvertretern und Epidemiologen und werden dankenswerterweise unterstützt vom Bundesamt für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen, der Haldimann-Stiftung, der Schweizerischen Vereinigung für Kleintiermedizin und Ihrer Albert-Heim-Stiftung. Unsere Arbeitsgruppe hat bereits verschiedene Projekte verwirklicht. Die deutlich reduzierte Lebenserwartung brachyzephaler Hunde wurde spezifisch für die Schweiz an Hand der Daten der nationalen Hundedatenband von Livia Reich in ihrer Dissertationsarbeit aufgezeigt [1] und wird in den nächsten Tagen im Schweizer Archiv für Tierheilkunde veröffentlicht. Ihre Daten sollen die Schweizer Bevölkerung für die Qualzuchtproblematik sensibilisieren. Erfahrungen und Einstellungen von Schweizer Tierärztinnen und Tierärzten zum Thema Brachyzephalie bei Hunden und mögliche Lösungsansätze hat Deborah Schneider in ihrer Masterarbeit unter der Leitung von Sonja Hartmann erfragt [36] Das Hauptziel der vorliegenden Studie war die Untersuchung von Blutparametern, welche sich zur objektiven Bewertung des Schweregrads des brachyzephalen obstruktiven Atemwegssyndroms (BOAS) eignen könnte, in der Hoffnung, einen Screeningtest basierend auf quantitativen Bluttests, welche die Atemfunktion widerspiegeln, entwickeln zu können. Dies würde eine kontrollierte Zuchtselektion von Hunden mit freien Atemwegen, d.h. von Hunden, die nicht an BOAS leiden (BOASΘ), ermöglichen und so bei den Nachkommen die Anzahl unter BOAS leidender Hunde (BOAS⊕) verringern. Zur Diagnostik von BOAS werden bisher verschiedene Modalitäten eingesetzt;[15; 16; 39; 40] diese sind jedoch invasiv, aufwändig oder subjektiv und eignen sich daher nur bedingt für Screening-Verfahren im Rahmen der Zuchtzulassung oder für Untersuchungen an Rassehundeausstellungen. Die bisher verwendeten wenig

invasiven Screening-Verfahren werden von den Hundebesitzern und auch von den Zuchtverbänden nicht oder schlecht akzeptiert. Neben der Subjektivität spielt dabei vor allem auch das fehlende Bewusstsein der Besitzer - die fehlende Wahrnehmung der Atemproblematik ihrer Hunde - eine Rolle. Mit einer objektiven Quantifizierung der Sauerstoffunterversorgung (Hypoxie) über die Bestimmung von Blutwerten wäre eine darauf basierende Zuchtselektion für Besitzer und Zuchtverbände vermutlich einfacher zu akzeptieren als nach Anwendung morphologischer Grenzwerte, welche den vom Besitzer geliebten Phänotyp „angreift“. In den Niederlanden wurde für die Zuchtauswahl von Affenpinscher, Belgischer Griffon, Boston Terrier, Brabanter Griffon, Brüsseler Griffon, Bulldog, Französische Bulldogge, Japan-Chin, King Charles Spaniel, Mops, Pekinese und Shih Tzu bereits 2014 ein Ampelsystem eingeführt, das auf tierärztlich attestierten äusseren Abmessungen von Körperteilen beruht. Inwieweit diese Massnahme erfolgreich war, ist fraglich, da zwischenzeitlich ein generelles Haltungs- und Importverbot von Hunden und Katzen mit schädlichen äusseren Merkmalen in den Niederlanden angekündigt wurde. Als problematisch wurde bei der Ankündigung jedoch die Definition der äußeren Merkmale, mit welchen objektiv festgestellt werden kann, dass sie dauerhaftes Leiden verursache, sowie der Bann von betroffenen Tieren in Werbespots, Anzeigen und sozialen Medien, angesprochen.

Absolute Ausstellungs- und Zuchtverbote verhindern die kontrollierte Zucht im eigenen Land und fördern die unkontrollierte Zucht und den Import dieser Hunde aus dem Ausland. Bereits heute stammt die Mehrheit der brachyzephalen Hunde, die in der Schweiz leben, aus dem Ausland. Import- und Haltungsverbote wiederum sind in ihrer Umsetzung nicht tierfreundlich. Ein Screeningtest basierend auf Blutwerten wäre wenig invasiv, günstig und im Vorfeld einer Verpaarung, vor dem Import und vor Hundeausstellungen einfach durchzuführen. Zudem könnte ein solcher Test tatsächlich die Lebensqualität des Hundes unabhängig von seiner Rasse widerspiegeln.

Im ersten Studienteil (Teil A), welche als Dissertationsarbeit von Sandra Kämpf [41] durchgeführt wurde, wurden Blutproben von Hunden brachyzephaler und nicht-

brachyzephaler Rassen verglichen. Im Vergleich zu nicht-brachyzephalen Hunden (NC) wies das Blut der brachyzephalen Hunde (BC) folgende charakteristische Veränderungen der Blutparameter auf:

(i) Anstieg der Retikulozytenzahl und der Anzahl unreifer Retikulozyten (Anzeichen einer Stress-Erythropoese),

(ii) höhere Erythrozyten-Verteilungsbreite (RDW) und höhere Werte der Vorwärtsstreuung in der BC-Gruppe (Anzeichen für eine abnorme Morphologie),

(iii) höheres mittleres korpuskulares Hämoglobin (MCH) und mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC), geringeres EMA-Fluoreszenzsignal (Anzeichen für Membranverlust),

(iv) eine Tendenz zu vermindertem O_hyper und O_min, was auf eine Dehydrierung der roten Blutkörperchen (RBCs) hindeutet,

(v) geringeres intraerythrozytäres reduziertes Glutathion (GSH), höhere Werte von NO-Derivaten im Plasma (Anzeichen für oxidativen Stress und Hypoxie),

(vi) höhere Plasmacortisolwerte, niedrige Lymphozyten- und Eosinophilenzahlen, hohe Neutrophilenzahlen (stressbedingte Veränderungen),

(vii) niedrige Plasmacholesterin- und Triglyceridwerte (anormaler Fettstoffwechsel).

Im zweiten Teil des Projekts (Teil B) wurden die Blutparameter zwischen BOAS-betroffenen (BOAS⊕) und nicht-betroffenen (BOASΘ) brachyzephalen französischen Bulldoggen verglichen. Ziel dieses Studienteils, welcher als Dissertationsarbeit von Claudia Schmid durchgeführt wurde, war die Suche nach möglichen Prädiktoren für den BOAS-Schweregrad im Blut brachyzephaler Hund. Diese sollten als Selektionskriterium für die Zuchtauswahl und für die Ausstellungszulassung von BOAS freien oder wenig betroffene Hunde (BOASΘ) dienen. Besitzer französischer Bulldoggen wurden für die Studienteilnahme ihrer

Hunde angefragt. Um die Anzahl der nötigen Probanden zu reduzieren, hatten wir uns im Vorfeld auf die französische Bulldogge geeinigt, da sie die zweithäufigste brachyzephale Hunderasse in der Schweiz ist und gemäss der internationalen Literatur sehr häufig von BOAS betroffen ist. Bei Vorstellung wurden nach einer genauen Anamneseerhebung und einer klinischen Allgemeinuntersuchung eine Blutprobe entnommen und in kodierte Blutröhrchen überführt. Der Code ermöglichte die spätere Blindanalyse der Daten. Untersucht wurden die Blutproben auf die Parameter, die sich im ersten Studienteil als am vielversprechendsten erwiesen hatten. Im Anschluss an die Blutentnahme wurde die Atmungsfunktion durch
1) die Ganzkörperplethysmographie (WBBP) beim ruhenden Hund und
2) eine standardisierte Gradierung der Atmungssymptome vor und nach einem 5-minütigen Geh- und einem 3-minütigen Trabtest bewertet [1, 2].
Bei der Ganzkörperplethysmographie sitzt der Hund in einer durchsichtigen Plexiglaskammer Zusätzlich wurden die anatomischen Verhältnisse von Kopf und Körper sowie die Oeffnungsweite der Nasenlöcher, mittels standardisierten Soft-Tape-Messungen bzw. der standardisierten Klassifizierung von Liu et al., bewertet. [3].
Leider konnten die WBBP-Messungen jedoch nicht wie vorgesehen für die BOAS-Einstufung verwendet werden, da das von Liu et al. [1, 2] entwickelte statistische Modell selbst bei Hunden mit qualitativ hochwertigen Rohdaten in unserer Stichprobenpopulation zu unzuverlässigen Ergebnissen führte. Bei Verwendung der gleichen Atemfunktionsparameter wie bei Liu et al., aber mit Cut-off-Werten, die auf der Grundlage unseres Datensatzes ausgewählt wurden, wurde eine 79 %ige Übereinstimmung mit der klinischen Bewertung erreicht. Es scheint also, dass Cut-off-Werte speziell für die Umgebungen und Bevölkerungsgruppen, in denen sie verwendet werden, festgelegt werden müssen. Damit der WBBP als unabhängiges Maß für den BOAS-Status verwendet werden kann, wäre eine Kalibrierung in einem größeren Datensatz erforderlich. Die Bewertung des BOAS-Status ((BOASΘ versus BOAS⊕) stützte sich daher ausschließlich auf die Belastungstests. Das Bewertungssystem für die Belastungstests unterscheidet vier Grade von BOAS-

Anzeichen (fehlend, leicht, mäßig, schwer). Fehlende und leichte BOAS-Anzeichen wurden als klinisch nicht betroffen (BOAS⊖), mittelschwere und schwere Anzeichen als klinisch betroffen (BOAS⊕) zusammengefasst [2]. Ungefähr die Hälfte der Hunde war betroffen bzw. nicht betroffen (40 Hunde BOAS⊕, 44 Hunde BOAS⊖). Allerdings war nur eine Minderheit der Hunde in unserer Stichprobe schwer betroffen (5 von 84), was die Aussagekraft der statistischen Analysen beeinträchtigt haben könnte. Von den untersuchten anatomischen Merkmalen waren nur stenotische Nasenlöcher signifikant und zuverlässig mit BOAS assoziiert.

Zu den klinisch-diagnostischen Laborparametern, die im Blut gemessen wurden, gehörten das komplette Blutbild, die Indizes der roten Blutkörperchen, die Plasmabiochemie einschließlich Cholesterin, Eiweiß, Lipasen, Triglyceride, Harnstoff, Na, K, Ca, Cl, Phosphat, Eiweiß (Gesamtprotein, Globulin, Albumin), Laktatdehydrogenase, Bilirubin, Glukose, Laktat, Cortisol. Zu den Untersuchungen, die im Labor der Red Blood Cell Group unter der Leitung von A. Bogdanova durchgeführt wurden, gehörten CO-Oximetrie, Bestimmung der Lorrca-Osmoscan-Indizes, Eosin-Maleimid-Bindungstest, Bestimmung der Redox-Status-Marker (GSH, GSSG und reduzierte Gesamtthiole, die als Fluoreszenzsignal von Monobromobiman (Mbbr) nachgewiesen wurden) und die Bestimmung der intraerythrozytären Ca2+-Werte mittels Durchflusszytometrie als Fluoreszenzsignal von Fluo-4-Farbstoff. Vorwärts- und Seitenstreuung wurden als indirekte Marker für die Morphologie der roten Blutkörperchen (RBC) verwendet.

Der Vergleich der einzelnen Parameter zwischen der BOAS⊕ und BOAS⊖ -Gruppe (Mann-Whitney-U-Statistik) ergab nur für einen Parameter, dem MCH, einen deutlichen Unterschied (höhere Werte in der BOAS⊕-Gruppe, $p<0,05$). Die Gruppe der Parameter, die für weitere statistische Analysen ausgewählt wurden, umfasste Parameter, die einen Schwellenwert von $p<0,2$ erreichten (Tabelle 1).

Um die Assoziation zwischen der klinischen Manifestation des BOAS und den ausgewählten Blutparametern zu bewerten, wurde eine ROC-Kurven-Variablenbedeutungsanalyse und die Boruta-Analyse (Abb. 1) durchgeführt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die MCH- und PL-Anzahl sowie die Häufigkeit

der Zellen in der hochfluoreszierenden Mbbr-Fraktion (HF-Mbbr) die wichtigsten "wichtigen" Variablen sind (Abb. 1A, B). Die Hauptkomponentenanalyse für die kontinuierlichen Parameter aus Tabelle 1 ergab einen Zusammenhang zwischen dem Anteil der Zellen in der HF-Mbbr-Fraktion und der Anzahl der Retikulozyten, der unreifen Retikulozyten und der kernhaltigen Erythrozyten. Ein Anstieg der Erythrozytenzahl in dieser Fraktion spiegelt also höchstwahrscheinlich das Vorhandensein von unreifen Erythrozyten wider, die infolge der Stress-Erythropoese gebildet werden. Als zweiter Ansatz wurde eine logistische Regression mit allen Parametern durchgeführt und anschliessend diejenigen ausgewählt, die sich signifikant unterschieden. MCH war der einzige resultierende Parameter. Das Ergebnis der logistischen Regressionsanalyse ist in Anhang 2 dargestellt. Wird für MCH ein Grenzwert von 26 pg/rotes Blutkörperchen gewählt, so ist er ein möglicher Prädiktor des BOAS-Status (BOAS⊕ oder BOASΘ) mit einem positiven und negativen Vorhersagewert von 72,7 % bzw. 61,3 %. Möglicherweise würden sich die prädiktiven Werte bei einer höheren Teilnehmerzahl, die auch schwerer betroffene Hunde einschließt, verbessern: wir vermuten, dass der doch eher kleine Effekt, den wir in unserer Studie beobachtet haben, durch die geringe Anzahl schwer betroffener Hunde (fünf von 84) bedingt ist.

Derzeit halten wir die Bestimmung des MCHs als alleiniges Differenzierungsmerkmal zwischen BOAS⊕ oder BOASΘ aufgrund der ermittelten diagnostischen Genauigkeit für unzureichend. Die Untersuchung einer deutlich grösseren Anzahl von Probanden mit bekanntem BOAS-Status wäre daher erforderlich. Da erfreulicherweise die Schulung von Tierärzten für den auch von uns angewendeten «Trotting Test» bereits im Oktober begonnen hat, und die kynologische Vereinigung diesen Test vorschreiben will, haben wir die Hoffnung, dass wir so in Zukunft deutlich mehr Probanden zur Verfügung haben könnten. Inwieweit der MCH-Test in Zukunft vielleicht in Kombination oder auch in fraglichen Fällen eingesetzt werden wird, oder ob er sich doch als alleiniges Selektionskriterium eigenen könnte, bleibt abzuklären.

Reference list

1. Reich L, Hartnack S, Fitzi-Rathgen J, Reichler I: Lebenserwartung meso-, dolicho- und brachyzephaler hunderassen in der schweiz. Schweizer Archiv fur Tierheilkunde 2023 in press.
2. Weingart C, Kohn B, Siekierski M, Merle R, Linek M: Blepharitis in dogs: A clinical evaluation in 102 dogs. Veterinary dermatology 2019.
3. Waters A: At last! Action to stop brachy dogs ads. The Veterinary record 2017: 181(24):635.
4. Vallone LV, Enders AM, Mohammed HO, Ledbetter EC: In vivo confocal microscopy of brachycephalic dogs with and without superficial corneal pigment. Veterinary ophthalmology 2017: 20(4):294-303.
5. Poncet CM, Dupre GP, Freiche VG, Estrada MM, Poubanne YA, Bouvy BM: Prevalence of gastrointestinal tract lesions in 73 brachycephalic dogs with upper respiratory syndrome. The Journal of small animal practice 2005: 46(6):273-279.
6. Packer RM, Hendricks A, Tivers MS, Burn CC: Impact of facial conformation on canine health: Brachycephalic obstructive airway syndrome. PloS one 2015: 10(10):e0137496.
7. O'Neill DG, Jackson C, Guy JH, Church DB, McGreevy PD, Thomson PC, Brodbelt DC: Epidemiological associations between brachycephaly and upper respiratory tract disorders in dogs attending veterinary practices in england. Canine genetics and epidemiology 2015: 2:10.
8. Oechtering TH, Oechtering GU, Noller C: Structural characteristics of the nose in brachycephalic dog breeds analysed by computed tomography. Tieraerztl Prax K H 2007: 35(3):177-+.
9. Oechtering GU, Schlüter C, Lippert JP: Brachycephaly in dog and cat: A “human induced” obstruction of the upper airways. Pneumologie 2010: 64:450.
10. Miller A, Marchevsky A: Cranial thoracic vertebral canal stenosis in three juvenile large-breed brachycephalic dogs treated by unilateral hemilaminectomy. Veterinary and comparative orthopaedics and traumatology : VCOT 2017: 30(3):223-229.
11. Mielke B, Lam R, Ter Haar G: Computed tomographic morphometry of tympanic bulla shape and position in brachycephalic and mesaticephalic dog breeds. Veterinary radiology & ultrasound : the official journal of the American College of Veterinary Radiology and the International Veterinary Radiology Association 2017: 58(5):552-558.
12. Meola SD: Brachycephalic airway syndrome. Topics in companion animal medicine 2013: 28(3):91-96.
13. Lodato DL, Hedlund CS: Brachycephalic airway syndrome: Pathophysiology and diagnosis. Compendium (Yardley, PA) 2012: 34:E3.
14. Llewellyn-Zaidi A: Brachycephalic dog breeds. The Veterinary record 2016: 178(21):540.
15. Liu NC, Troconis EL, Kalmar L, Price DJ, Wright HE, Adams VJ, Sargan DR, Ladlow JF: Conformational risk factors of brachycephalic obstructive airway syndrome (boas) in pugs, french bulldogs, and bulldogs. PloS one 2017: 12(8):e0181928.
16. Liu NC, Adams VJ, Kalmar L, Ladlow JF, Sargan DR: Whole-body barometric plethysmography characterizes upper airway obstruction in 3 brachycephalic breeds of dogs. Journal of veterinary internal medicine 2016: 30(3):853-865.
17. Knowler SP, Galea GL, Rusbridge C: Morphogenesis of canine chiari malformation and secondary syringomyelia: Disorders of cerebrospinal fluid circulation. Frontiers in veterinary science 2018: 5:171.
18. Kim YJ, Lee N, Yu J, Lee H, An G, Bang S, Chang J, Chang D: Three-dimensional volumetric magnetic resonance imaging (mri) analysis of the soft palate and nasopharynx in brachycephalic and non-brachycephalic dog breeds. The Journal of veterinary medical science 2019: 81(1):113-119.

19. Kaye BM, Rutherford L, Perridge DJ, ter Haar G: Relationship between brachycephalic airway syndrome and gastrointestinal signs in three breeds of dog. Journal of Small Animal Practice 2018: 59(11):670-673.
20. Jeandel A, Garosi L: Gait abnormalities in brachycephalic breeds: Should we be more concerned? The Veterinary record 2018: 182(6):164-166.
21. Hughes JR, Kaye BM, Beswick AR, Ter Haar G: Complications following laryngeal sacculectomy in brachycephalic dogs. The Journal of small animal practice 2018: 59(1):16-21.
22. Hale F: Stop brachycephalism, now! The Canadian Veterinary Journal 2013: 54(2):185.
23. Gyles C: Brachycephalic dogs—time for action. The Canadian Veterinary Journal 2017: 58(8):777.
24. Gutierrez-Quintana R, Guevar J, Stalin C, Faller K, Yeamans C, Penderis J: A proposed radiographic classification scheme for congenital thoracic vertebral malformations in brachycephalic "screw-tailed" dog breeds. Veterinary radiology & ultrasound : the official journal of the American College of Veterinary Radiology and the International Veterinary Radiology Association 2014: 55(6):585-591.
25. Guevar J, Penderis J, Faller K, Yeamans C, Stalin C, Gutierrez-Quintana R: Computer-assisted radiographic calculation of spinal curvature in brachycephalic "screw-tailed" dog breeds with congenital thoracic vertebral malformations: Reliability and clinical evaluation. PloS one 2014: 9(9):e106957.
26. Goddard P: Brachycephalic dog breeds. The Veterinary record 2016: 178(22):566.
27. Fawcett A, Barrs V, Awad M, Child G, Brunel L, Mooney E, Martinez-Taboada F, McDonald B, McGreevy P: Consequences and management of canine brachycephaly in veterinary practice: Perspectives from australian veterinarians and veterinary specialists. Animals : an open access journal from MDPI 2018: 9(1):3.
28. Farrow T, Keown AJ, Farnworth MJ: An exploration of attitudes towards pedigree dogs and their disorders as expressed by a sample of companion animal veterinarians in new zealand. New Zealand veterinary journal 2014: 62(5):267-273.
29. Downing F, Gibson S: Anaesthesia of brachycephalic dogs. The Journal of small animal practice 2018: 59(12):725-733.
30. Darcy HP, Humm K, Ter Haar G: Retrospective analysis of incidence, clinical features, potential risk factors, and prognostic indicators for aspiration pneumonia in three brachycephalic dog breeds. Journal of the American Veterinary Medical Association 2018: 253(7):869-876.
31. Life expectancy of dogs: How long will my dog live? 2018.
32. Working together to tackle brachy issues. The Veterinary record 2018: 182(1):5.
33. Keeping of brachycephalic breeds 'not cool', says lord as debate continues on dog welfare. The Veterinary record 2017: 181(12):308.
34. Enough is enough with brachy advertising. The Veterinary record 2017: 181(24):636-637.
35. Brachycephalic dogs: Bva calls for revised breed standards. Veterinary Record 2016: 179(6):131-131.
36. Schneider D: Brachycephalie bei hunden: Erfahrungen und einschätzungen von schweizer tierärztinnen und tierärzten. University Zurich. 2020.
37. Roedler FS, Pohl S, Oechtering GU: How does severe brachycephaly affect dog's lives? Results of a structured preoperative owner questionnaire. The Veterinary Journal 2013: 198(3):606-610.
38. Dupre G, Heidenreich D: Brachycephalic syndrome. The Veterinary clinics of North America Small animal practice 2016: 46(4):691-707.
39. Lilja-Maula L, Lappalainen AK, Hyytiainen HK, Kuusela E, Kaimio M, Schildt K, Molsa S, Morelius M, Rajamaki MM: Comparison of submaximal exercise test results and severity of brachycephalic obstructive airway syndrome in english bulldogs. Veterinary journal (London, England : 1997) 2017: 219:22-26.

40. Oechtering GU, Pohl S, Schlueter C, Lippert JP, Alef M, Kiefer I, Ludewig E, Schuenemann R: A novel approach to brachycephalic syndrome. 1. Evaluation of anatomical intranasal airway obstruction. Veterinary surgery : VS 2016: 45(2):165-172.
41. Kämpf S F, S, Van Cromvoirt A, Bogdanov N,Hartnack S, Stirn, M, Hofmann-Lehmann, R, Reichler, IM, Bogdanova, A*: Differences in blood parameters reveal more oxidation and stress in brachycephalic dogs compared to the non-brachycephalic ones. Frontiers 2023 submitted.

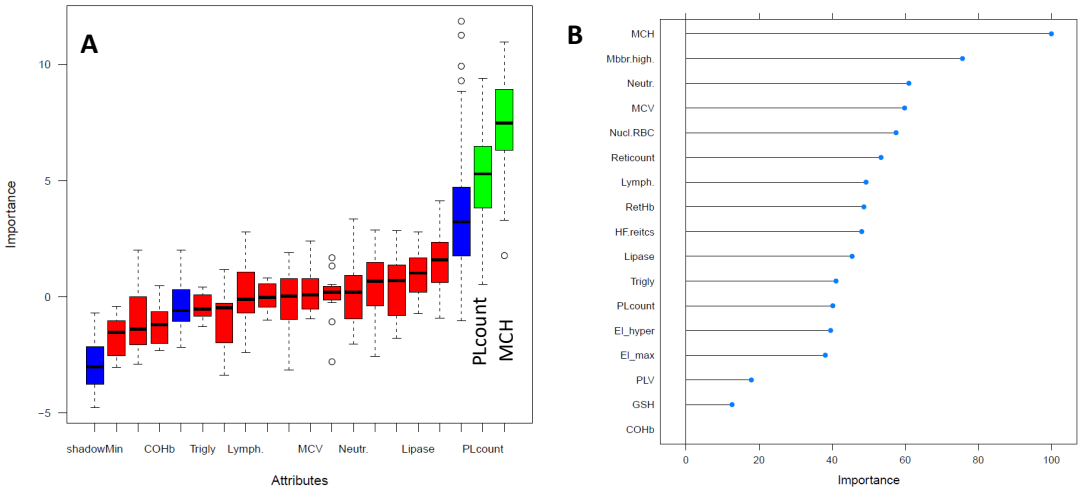

Figure 1. *Graphs for the Boruta algorithm (A) and the ROC curve of variable importance (B) analysis on the parameters from Table 1.*

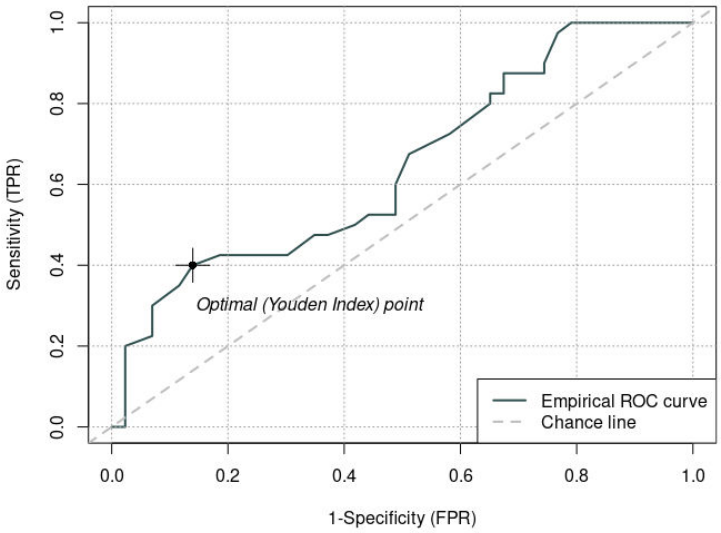

Figure 2. *Specificity and sensitivity of the MCH as a predictor of the* BOAS⊕ *state at a cut-off of 26 pg/cell based on the ROC algorithm.*

Suppl. 2
Logistic regression with all parameters and then selecting only those that were significant:

```
Call:
glm(formula = Brachycephaly ~ MCH, family = binomial(probit),
    data = brachy)

Deviance Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-1.6071  -1.1272  -0.7368   1.1236   1.5128

Coefficients:
            Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept)  -8.7908     3.6995  -2.376   0.0175 *
MCH           0.3452     0.1459   2.366   0.0180 *
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)

    Null deviance: 114.95  on 82  degrees of freedom
Residual deviance: 109.28  on 81  degrees of freedom
  (2 observations deleted due to missingness)
AIC: 113.28
```

Table 1: Parameters that reached the p<0.2 level of significance between the BOAS⊕ or BOASΘ groups in Mann-Whitney test

*indicates the parameters , which differ between the BOAS⊕ and the BOASΘ group

Parameters	Unit	Median/mean BOASΘ (n=44)	Median/mean BOAS⊕ (n=40)	P value (two-tailed)
COHb	%	3.69	4.07	0.118
Reticulocytes	cells/µL	43953	53900	0.132*
Reti-Hb	pg	27.21	27.56	0.141
Immature (HF) retics	%	10.2	11.6	0.156*
Nucleated RBCs	$x10^6$/µL	0	0	0.06
MCH	**pg**	**25.10**	**25.55**	**0.024***
MCV	fl	68.10	68.80	0.084
EImax	AU	0.608	0.605	0.177
EIhyper	AU	0.304	0.302	0.168
GSH	µmol/gHb	4.35	3.89	0.175*
% high Fl Mbbr (HF-Mbbr (bulk thiols))	%	0.83	1.24	0.059
% high Ca2+ cells	%	1.06	1.22	0.129
Neutrophils	%	63.69	66.47	0.103
PCT (Plateletcrit)	%	0.300	0.335	0.122
Platelet count	x10E3/µL	312	339	0.163
Triglycerides	mmol/L	0.60	0.60	0.159*
Lipase	U/L	51.5	59.9	0.140