

Aus dem Labor LABOKLIN in Bad Kissingen<sup>1</sup> und dem Department of Population Health and Pathobiology, College of Veterinary Medicine, North Carolina State University, Raleigh, NC, USA<sup>2</sup>

## Durchflusszytometrische Bestimmung der Lymphozyten-subpopulationen im peripheren Blut von Hunden und Katzen

Ines LANGBEIN<sup>1</sup>, Petra KÜHNLEIN<sup>1</sup>, Christopher SCHIMMER<sup>1</sup>, Thomas W. VAHLENKAMP<sup>2</sup>, Janine HUEBNER<sup>1</sup> und Elisabeth MÜLLER<sup>1</sup>

### Zusammenfassung

#### Durchflusszytometrische Bestimmung der Lymphozyten-subpopulationen im peripheren Blut von Hunden und Katzen

Um in der Kleintiermedizin eine Aussage über den Immunstatus bei erkrankten Patienten machen zu können, haben wir die Quantifizierung der Lymphozyten-subpopulationen im peripheren Blut mittels Durchflusszytometrie in einem Routinelabor etabliert. Zur Erstellung von Normwerten für die von uns verwendeten Methoden und Antikörper wurde die Anzahl der B-Zellen, T-Zellen sowie CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten im Blut von 31 klinisch gesunden Katzen und 36 Hunden gemessen und nach einem standardisierten Verfahren ausgewertet. Die für die Lymphozyten-subpopulationen ermittelten Werte sind vergleichsweise in der Literatur beschrieben. Zur Bestimmung des Immunstatus bei erkrankten Tieren als zusätzliche diagnostische Hilfe für den praktizierenden Tierarzt wurden weiterhin Blutproben von elf mit dem feline Immunschwächevirus (FIV) infizierte Katzen untersucht. Dabei konnten die für die FIV-Infektion charakteristische Abnahme der CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation und Inversion des CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Quotienten nachgewiesen werden.

### Summary

#### Generation of reference values for the characterization of lymphocyte subpopulations in the peripheral blood of dogs and cats

To provide the diagnostic tool of immunophenotyping to small animal practitioners we established the quantitation of lymphocyte subpopulations in the peripheral blood by flow cytometric analysis in a routine diagnostic laboratory. We determined reference values specific for the antibodies and methods used. Relative percentages of B-lymphocytes and T-lymphocyte subsets in the peripheral blood from 36 clinically healthy normal dogs and 31 cats were measured and analyzed using a standardized gating technique. The results of the quantitative assessment of the lymphocyte subpopulations are comparable to the values reported for these animals in the literature. To determine the lymphocyte subpopulations in animals with clinical signs, blood samples from 11 feline immunodeficiency virus (FIV) positive cats were analyzed. All cats showed a decreased percentage of CD4<sup>+</sup> lymphocytes and a characteristic inversion of the CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T cell ratio.

### Einleitung

Die Lymphozyten als Träger der spezifischen Immunantwort stellen sich morphologisch einheitlich dar, bestehen jedoch aus funktionell unterschiedlichen Zellen (ABBS et al., 1996).

Die einzelnen Lymphozyten-subpopulationen lassen sich auch bei Hunden und Katzen zuverlässig mit Hilfe verschiedener monoklonaler Antikörper differenzieren. Es können B- und T-Lymphozyten unterschieden werden und die T-Lymphozyten wiederum in CD(= „Cluster of Differentiation“)-4-positive T-Helferzellen (CD4<sup>+</sup>) und CD8-positive zytotoxische T-Zellen (CD8<sup>+</sup>) differenziert werden (DEAN et al., 1991; CHABANNE et al., 2000; FALDYNA et al., 2001).

Veränderungen der Anteile der verschiedenen Subpopulationen zueinander treten bei verschiedenen

Erkrankungen auf und ermöglichen Rückschlüsse auf den Immunstatus des Patienten (CHABANNE et al., 2000). Hier sind Anwendungsgebiete für diese Untersuchung zu sehen. Bei Hunden sind kongenitale schwere, kombinierte Immundefekte und T-Zelldefekte bekannt, die mit einer Verminderung der T- und B-Zellen bzw. ausschließlich mit einer Verminderung der T-Zellen einhergehen (JUNGI, 2000). Erkrankungsdispositionen verschiedener Hunderassen, wie Demodikose und Pyodermien, werden ebenfalls mit Störungen der zellulären Immunabwehr in Verbindung gebracht (CHABANNE et al., 1995; CASWELL et al., 1997). Gleiches gilt für den systemischen Lupus erythematodes (CHABANNE et al., 1994).

Bei Katzen kommt dem Immunstatus eine besondere Bedeutung bei Infektionen mit dem feline Immunschwächevirus (FIV) und dem feline Leukosevirus (FeLV) zu. Verschiedene Untersuchungen weisen

darauf hin, dass sich insbesondere bei FIV-Infektionen das Fortschreiten der Erkrankung, ähnlich wie bei der Infektion des Menschen mit dem humanen Immunschwächevirus (HIV), mit einem Abfall der CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten verbinden lässt (ACKLEY et al., 1990; NOVOTNEY et al., 1990; BISHOP et al., 1992; HOFFMANN-FEZER et al., 1992; HOFFMANN-FEZER et al., 1996; WALKER et al., 1994; HOFMANN-LEHMANN et al., 1997).

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Erstellung von Referenzbereichen für die Anteile von CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten (T-Helferzellen), CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten (zytotoxische T-Zellen), CD21<sup>+</sup>-Lymphozyten (B-Zellen) und CD3<sup>+</sup>-Lymphozyten (T-Zellen) im peripheren Blut von Hunden und Katzen mit den von uns verwendeten Methoden und Geräten. Nachfolgend sollen diese als Grundlage für die Interpretation von Werten erkrankter Tiere dienen. Es sollte weiterhin untersucht werden, ob der in der Literatur beschriebene Abfall der CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten und des CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Verhältnisses bei FIV-infizierten Katzen nachvollzogen werden kann.

## Material und Methoden

### Probenmaterial

Zur Erstellung der Referenzbereiche wurden zwischen November 2002 und Mai 2003 EDTA-Blutproben von insgesamt 36 Hunden und 31 Katzen untersucht. Parallel wurde von jeder Blutprobe ein Differentialblutbild erstellt und die Erythrozytenzahl, der Hämatokrit, der Hämoglobingehalt, die Gesamtleukozytenzahl und die Thrombozytenzahl bestimmt. Es wurden nur Proben verwendet, deren Entnahme nicht länger als 24 h zurücklag und deren Blutparameter keine deutlichen Abweichungen ( $\pm 10\%$ ) vom Referenzbereich zeigten. Die untersuchten Hunde waren zwischen zwei und zwölf Jahren alt (im Mittel 6,5 Jahre) und gehörten 20 verschiedenen Rassen an, fünf waren Mischlinge und bei einem Tier war die Rasse unbekannt. Je 14 Hunde waren weiblichen bzw. männlichen Geschlechts. Je vier waren kastrierte weibliche bzw. männliche Hunde. Die Blutproben der Katzen stammten von Hauskatzen und verschiedenen Rassekatzen, die zwischen zwölf Monaten und zwölf Jahre alt waren (im Mittel 4,1 Jahre). Von den Katzen waren elf Kater, neun weibliche Tiere, sieben kastrierte männliche und vier kastrierte weibliche Tiere. Alle Katzen wurden von den einsehenden Tierärzten als klinisch gesund beurteilt und waren FIV-Antikörper und FeLV-Antigen negativ.

Die Blutproben der elf FIV-Antikörper-positiven Katzen waren ebenfalls bei Eingang im Labor nicht älter als 24 Stunden. Diese Katzen waren zwischen vier und zwölf Jahren alt (im Mittel 7,8). Sieben Tiere waren Kater, zwei männlich kastriert und zwei weiblich kastriert. Zwei Tiere waren nach Aussagen der jeweils behandelnden Tierärzte klinisch gesund, vier hatten

gering- bis hochgradige Stomatitis/Gingivitis, fünf wiesen einen schlechten Allgemeinzustand auf. Eine Katze hatte multiple Abszesse, eine Katze wurde wegen starken Nasenblutens und eine Katze wegen Gastritis behandelt. Drei Katzen wurden im Verlauf der weiteren Behandlung euthanasiert, bei vier Katzen hatte sich der Zustand gebessert.

### Färbung der Antigene

Zur spezifischen Identifizierung der Lymphozyten-subpopulationen wurden Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)- und R. Phycoerythrin (RPE)-konjugierte monoklonale Antikörper der Fa. Serotec (Oxford, UK) eingesetzt (siehe Tabelle 1). Für die Detektion von CD45 bei Katzen wurde eine indirekte Methode verwendet. Der nicht konjugierte anti-CD45 Antikörper wurde mit einem FITC-konjugierten anti-mouse-IgG Sekundärantikörper gefärbt (siehe Tabelle 1). Da der CD5-spezifische Antikörper bei Katzen nicht mit B-Zellen reagiert (ACKLEY und COOPER, 1992), wurde er von uns zur Identifizierung der felines T-Lymphozyten eingesetzt. Als negative Kontrolle wurde RPE- und FITC-konjugiertes Mäuse-IgG1 (Fa. Serotec) verwendet.

Tabelle 1: Verwendete Antikörper

Antikörper	Klon	Spezifität	Zellpopulation
<b>Hund</b>			
MCA 1042 PE	YKIX 716.13	cCD45	Leukozyten
MCA 1781 PE	CA2.1D6	Evtl. CD21-Homolog	B-Zellen
MCA 1774F	CA17.2A12	cCD3	T-Lymphozyten
MCA 1038F	YKIX 302.9	cCD4	T-Helferzellen
MCA 1039PE	YCATE 55.9	cCD8	zytotoxische und Suppressor T-Zellen
<b>Katze</b>			
MCA 1408 + STAR 9 B	WC45a	fCD45	Leukozyten
MCA 1781 PE	CA2.1D6	Evtl. CD21-Homolog	B-Zellen
MCA 2038 F	FE1.1B11	fCD5	T-Lymphozyten
MCA 1346 F	vpg 34	fCD4	T-Helferzellen
MCA 1347 PE	vpg 9	fCD8	zytotoxische und Suppressor T-Zellen

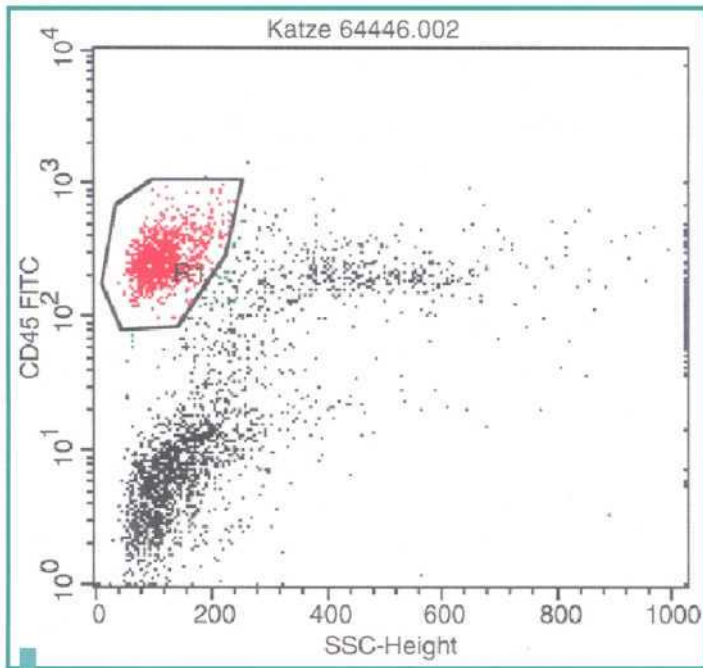
100  $\mu$ l Vollblut wurden für 30 min bei Raumtemperatur mit dem Antikörper inkubiert und anschließend die Erythrolyse durchgeführt.

Die Erythrozyten von Katzen wurden mit der FACS Lysing Solution (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg), die von Hunden mit dem Erythrolyse-Puffer (RBC Lysing Buffer) der Fa. Serotec jeweils nach Herstelleranleitung lysiert und die Lymphozyten anschließend zweimal mit CellWASH-Lösung (Fa. Becton Dickinson) gewaschen.

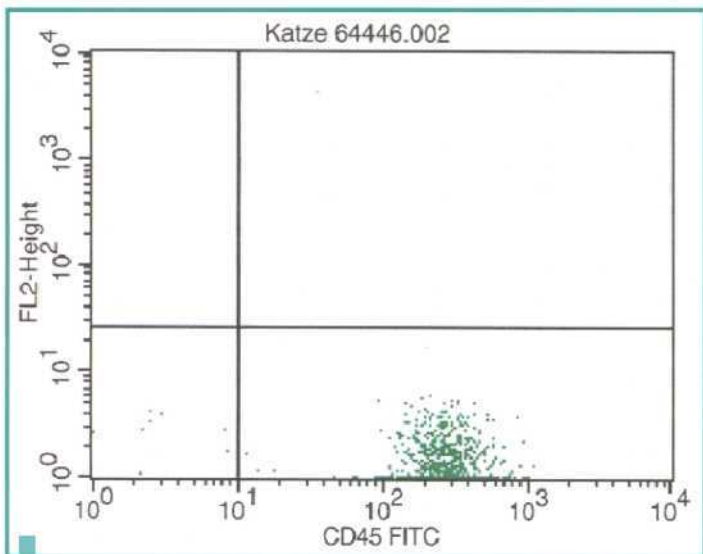
Bei der Detektion von CD45 auf Katzenleukozyten wurden die Zellen nach der Inkubation mit dem ersten Antikörper mit 2 ml CellWASH-Lösung (Fa. Becton Dickinson) gewaschen und eine Inkubation mit dem Zweitantikörper wie oben beschrieben durchgeführt.

### Messung und Auswertung

Die Lymphozyten wurden mit dem Durchflusszytometer FACScalibur von Becton Dickinson gezählt. Pro Messung wurden 10 000 Leukozyten erfasst und mit der CELLQuest-Software Vers. 3.3 (Fa. Becton Dickinson) ausgewertet.



**Abb. 1:** Erfassen der Lymphozytenpopulation im Auswertungsfenster anhand der Parameter Seitwärtsstreulicht und CD45-positive Fluoreszenz.



**Abb. 2:** Dot-plot-Darstellung der CD45-positiven Zellen (Lymphozyten) aus dem Auswertungsfenster von Abb. 1. 99 % aller Zellen im Auswertungsfenster sind CD45-positiv (rechter unterer Quadrant).

Die Auswertungsfenster wurden mit Hilfe einer standardisierten Methode in Anlehnung an BYRNE et al. (2000 b) gesetzt. Im Unterschied dazu wurde die Lymphozytenpopulation anhand der CD45-spezifischen Fluoreszenz und der Seitwärtsstreuung des Laserlichts (SSC) erfasst. Im Punkthistogramm (dot-plot) SSC gegen CD45-Fluoreszenz (Abb. 1) wurde diejenige Population ausgewählt, die im Seitwärtsstreulicht am weitesten links lag und in der CD45-Fluoreszenz positiv war. Diese Population entspricht aufgrund ihrer Lichtbrechungs- und Fluoreszenzeigenschaften den Lymphozyten. Um die Reinheit der Population im so festgelegten Auswertungsfenster zu beurteilen, wurden anschließend die Zellen im Vorwärts-Seitwärts-Streulichtmodus beurteilt.

Die Reinheit der Lymphozytenpopulation im Auswertungsfenster wurde auf mindestens 80 % eingestellt (Abb. 2).

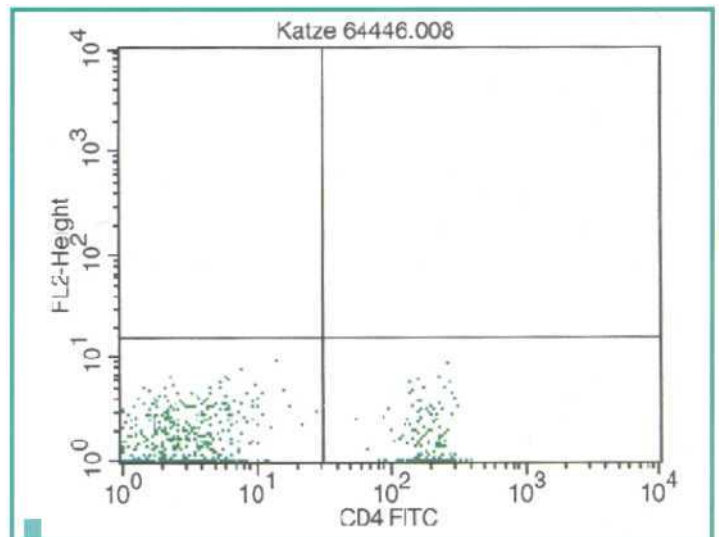
Zur Bestimmung der einzelnen Subpopulationen wurden die Fluoreszenz-Intensitätsverteilungen gemessen und als Punkthistogramm (dot-plot) dargestellt.

Die Messungen wurden im Doppelsatz durchgeführt, wobei eine Differenz von maximal 15% zwischen beiden Ansätzen toleriert wurde.

Die statistische Auswertung erfolgte mit MS Excel® (Fa. Microsoft). Die Analyse auf Signifikanz erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test für nicht-parametrische Daten.

### Ergebnisse

Die Abbildung 3 zeigt ein für die verschiedenen Messungen typisches Bild in der Zweiparameter-Punkthistogramm-(dot-plot)-Darstellung. Die Fluoreszenz-



**Abb. 3:** Darstellung der CD4-positiven Zellen im dot-plot (rechter unterer Quadrant).

positiven Zellen finden sich im linken oberen bzw. rechten unteren Quadranten, die Fluoreszenz-negativen Zellen im linken unteren Quadranten.

Mit der verwendeten Methode zur Festlegung des Auswertungsfensters konnte bei den von uns untersuchten Hunden im Durchschnitt eine Reinheit der Lymphozytenpopulation von 88,3 % und bei den klinisch gesunden Katzen von im Mittel 96,6 % erreicht werden. Die Reinheit der Population betrug jedoch bei jeder Messung mindestens 80 % und die Auswertungsfenster wurden so gelegt, dass nahezu alle CD45-positiven Zellen erfasst wurden (Abb. 1 und 2).

Die gemessenen Werte bei den gesunden Hunden und Katzen sind in Tabelle 2 und 3 zusammengefasst. Im Mittel waren 12,2 % der Lymphozyten im Auswertungsfenster CD21-positiv (B-Zellen), 76,6 % CD3-positiv (T-Zellen), 37,2 % CD4-positiv und 22,8 % CD8-positiv. Das CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Verhältnis lag im Mittel bei 1,72.

In den Blutproben von klinisch gesunden Katzen wurden im Mittel 24,4 % CD21- positive Lymphozyten (B-Zellen), 67,5 % CD5- positive Lymphozyten (T-Zellen), 34,7 % CD4- positive und 25,9 % CD8- positive Lymphozyten im Auswertungsfenster gemessen. Das mittlere CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Verhältnis lag bei 1,48.

Bei den Hunden konnte eine tendenzielle Abnahme des CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Verhältnisses mit zunehmendem Alter beobachtet werden (siehe Abb. 4). Dies lag weniger an einer Abnahme der CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten, als vielmehr an einer Zunahme des Anteils der CD8<sup>+</sup>-Zellen bei älteren Hunden.

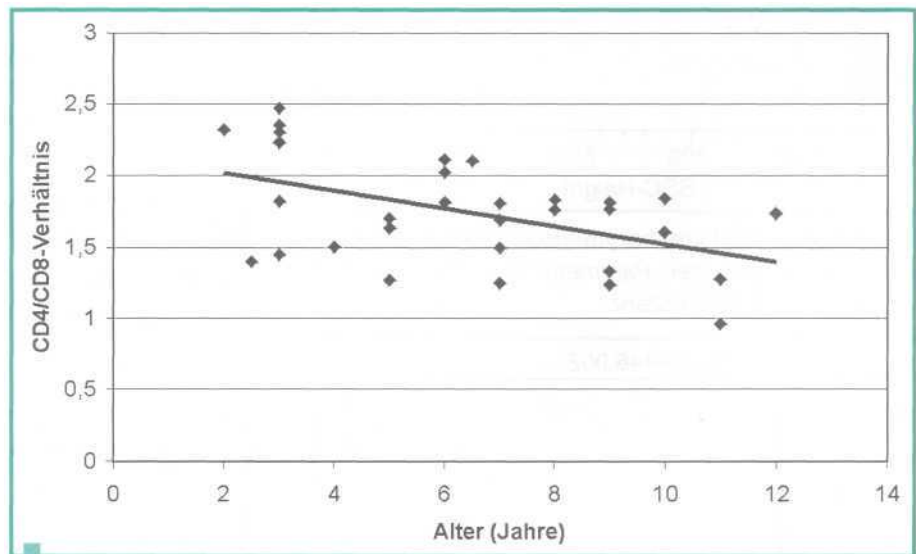
Allgemein zeigten die Messwerte bei Katzen eine weitere Streuung als bei Hunden. Insbesondere der

**Tabelle 2: Normalwerte für Hunde (Anteil der jeweiligen Subpopulation in %)**

Anzahl: n = 36	CD21-Homolog (B-Zellen)	CD3 <sup>+</sup> (T-Zellen)	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> -Quotient
Mittelwert	12,2	76,6	37,2	22,8	1,72
Standardabweichung	4,18	6,76	4,22	5,51	0,39
95%-Vertrauensbereich	10,7–13,6	74,3–78,8	35,8–38,7	20,9–24,6	1,58–1,85
Wertebereich	6,2–22,3	65,4–87,1	28,7–48,1	15,8–39,2	0,92–2,47

**Tabelle 3: Normalwerte für Katzen (Anteil der jeweiligen Subpopulation in %)**

Anzahl: n = 36	CD21-Homolog (B-Zellen)	CD3 <sup>+</sup> (T-Zellen)	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> -Quotient
Mittelwert	24,0	67,2	34,8	26,0	1,47
Standardabweichung	9,18	9,14	8,18	7,98	0,60
95%-Vertrauensbereich	20,7–27,4	63,9–70,6	31,8–37,8	23,0–28,9	1,24–1,69
Wertebereich	9,0–47,0	43,4–80,8	21,2–49,1	14,2–47,0	0,60–3,35



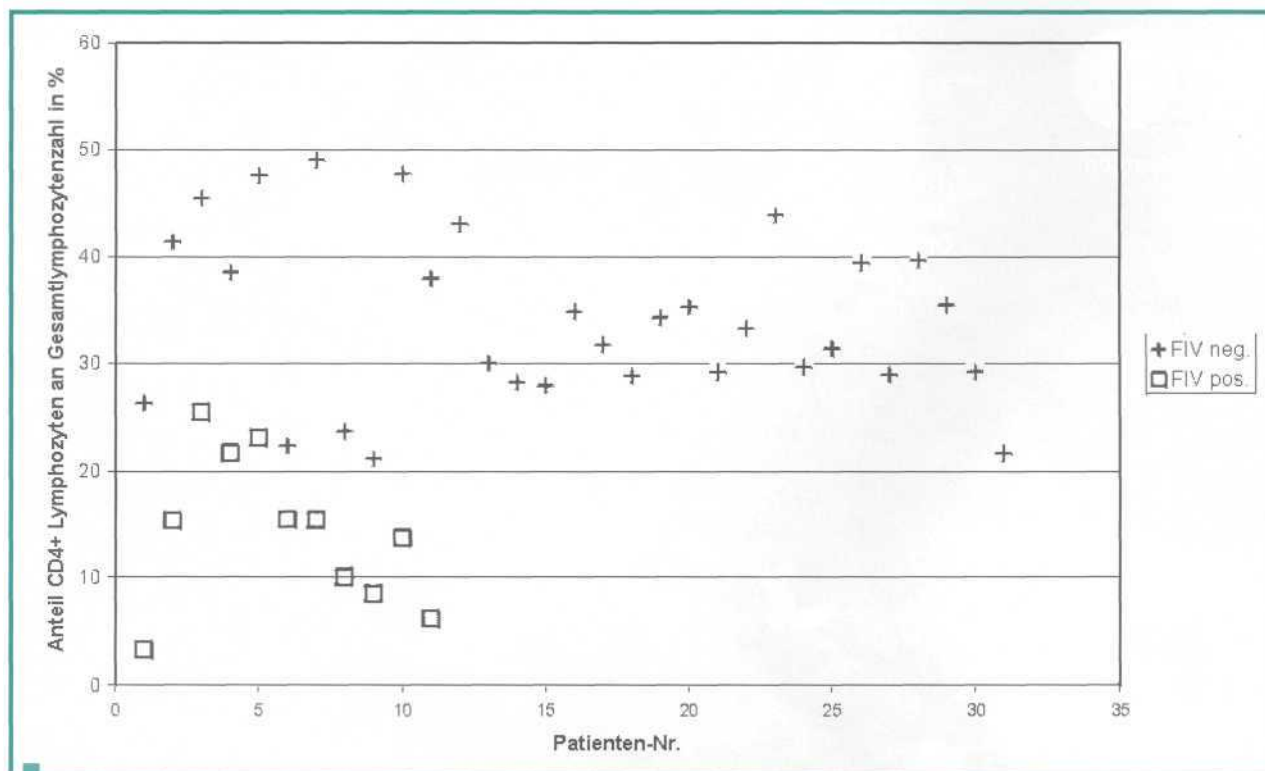
**Abb. 4: Abnahme des CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Verhältnisses bei älteren Hunden.**

Anteil der B-Lymphozyten war bei den Katzen über einen weiteren Bereich gestreut als bei den Hunden.

Die Untersuchung der Blutproben von elf FIV-Antikörper positiven Katzen ergab im Mittel mit 15,6 % einen signifikant ( $p < 0,001$ ) geringeren Anteil an CD4<sup>+</sup>-Zellen und mit 0,71 ein signifikant ( $p = 0,0066$ ) geringeres CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Verhältnis (Tab. 4). Insbesondere die Anteile der CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten waren bei den FIV-positiven Katzen deutlich niedriger, als bei den klinisch gesunden, FIV-negativen Katzen (siehe Abb. 5).

**Tabelle 4: Werte FIV-positiver Katzen im Vergleich zu FIV-negativen Katzen (Anteil der jeweiligen Subpopulation in %) (\* = Unterschiede statistisch signifikant)**

	D21-Homolog (B-Zellen)		CD5 <sup>+</sup> (T-Zellen)		CD4 <sup>+</sup>		CD8 <sup>+</sup>		CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> - Quotient	
	FIV-pos. n = 11	FIV-neg. n = 31	FIV-pos.	FIV-neg.	FIV-pos.	FIV-neg.	FIV-pos.	FIV-neg.	FIV-pos.	FIV-neg.
Mittelwert	14,7	24,0	49,0	67,2	14,4*	34,8	28,4	26,0	0,76*	1,47
Standardabweichung	6,31	9,18	17,04	9,14	6,76	8,18	15,28	7,98	0,57	0,60
Wertebereich	1,1–22,9	9,0–47,0	14,2–74,1	43,4–80,8	3,3–25,5	21,2–49,1	3,5–62,3	14,2–47,0	0,13–1,75	0,60–3,35



**Abb. 5: Abnahme des Anteils von CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten im Blut FIV-infizierter Katzen.**

### Diskussion

Die Phänotypisierung von Lymphozyten kann in der Humanmedizin genutzt werden, um die Immunantwort bei bestimmten Erkrankungen zu charakterisieren, Immundefekte zu erkennen und als prognostischer Parameter dienen. Ferner wird sie zur Immuntypisierung von Leukämien und Lymphomen verwendet. Inzwischen sind Antikörper gegen Lymphozyten-Antigene auch für Hunde und Katzen kommerziell erhältlich und standardisierte Methoden zur Auswertung der Messdaten liegen vor (BYRNE et al., 2000 B).

In der Veterinärmedizin wurde die Durchflusszytometrie zur Bestimmung von Lymphozytensubpopulationen inzwischen vielfach eingesetzt, um bei vielen verschiedenen Erkrankungen den Immunstatus zu

charakterisieren. Insbesondere das Fortschreiten der FIV- und FeLV-Infektionen bei Katzen wurde mit dieser Methode beobachtet, wobei eine Anwendung in der Routinediagnostik bislang fehlte (QUACKENBUSH et al., 1990; HOFFMAN-FEZER et al., 1992, 1996; WALKER et al., 1994; VAHLENKAMP et al., 1996; HOFMANN-LEHMANN et al., 1997).

Die prozentualen Anteile der Lymphozytensubpopulationen bei gesunden Hunden und Katzen fallen bei verschiedenen Untersuchern leicht unterschiedlich aus. Dafür können außer der Rasse und dem Alter der untersuchten Tiere auch die verwendeten Antikörper und der Typ des verwendeten Durchflusszytometers verantwortlich sein sowie die Methode der Probenaufarbeitung und die Auswertung der Messdaten.

Die von uns gemessenen Mittelwerte und Standardabweichungen für die einzelnen Lymphozyten-Antigene entsprechen weitgehend den von anderen Autoren ermittelten (DEAN et al., 1991; WALKER et al., 1994; CHABANNE et al., 1995; FRANZ, 1996; HOFFMANN-FEZER et al., 1996; BYRNE et al., 2000 A; FALADYNA et al., 2001; WINNICKA et al., 2002).

Zur Identifizierung der Lymphozytenpopulation haben wir, wie in Material und Methoden beschrieben, jedoch nicht ein T-Zell spezifisches Antigen verwendet, sondern die leukozytenspezifische CD45 Fluoreszenz und das Seitwärtsstreulicht benutzt. Dadurch konnten wir eine höhere Reinheit der Lymphozytenpopulation im Auswertungsfenster erreichen.

Die Summe aus CD21- und CD3- bzw. CD5-positiven Zellen sollte in etwa die Gesamtzahl der Lymphozyten repräsentieren, d. h. in etwa den CD45-positiven Zellen im Auswertungsfenster entsprechen. Bei unseren Messungen ergab die Summe aus CD21 - und CD3- bzw. CD5-positiven Zellen im Mittel 88,8 % bzw. 91,2 % für die Normalwerte bei Hunden und Katzen. BYRNE et al. (2000 A) und GREELEY et al. (1996) erreichten bei ihren Messungen hier etwas höhere Werte (94,6 % bzw. 94,9 %). Folglich haben diese Autoren auch etwas höhere Prozentwerte bei den einzelnen Lymphozytenpopulationen gemessen als wir.

Die von anderen Autoren ermittelten Werte bewegen sich etwa in dem von uns ermittelten Bereich (DEAN et al., 1991; FALADYNA et al., 2001).

Als Methode zur Isolierung der Lymphozyten aus dem Blut wurde von uns die Erythrolyse gewählt. Angaben in der Literatur (FALADYNA et al., 2001; DEAN et al., 1991) und eigene Beobachtungen (unveröffentlicht) weisen darauf hin, dass diese Methode nicht nur einfacher und schneller ist, sondern auch zu weniger Veränderungen der CD8<sup>+</sup>-Zellpopulation führt, als die Separierung mittels Dichtezentrifugation. Darüber hinaus erweist sich diese Methode aufgrund der geringeren Blutmenge für die Routinediagnostik, insbesondere bei der Katze, als weitaus geeigneter.

Es ist bekannt, dass das Alter der Tiere einen Einfluss auf die Zusammensetzung der Lymphozytenpopulationen hat. In dieser Studie wurde nur Blut von Hunden verwendet, die älter als zwei Jahre waren. Von jüngeren Hunden (bis ca. ein Jahr) ist bekannt, dass der Anteil der B-Zellen im peripheren Blut wesentlich höher und der Anteil an CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten deutlich niedriger ist als bei erwachsenen Tieren (FALADYNA et al., 2001; TOMAN et al., 2002).

Die von uns untersuchten älteren Hunde zeigten höhere Anteile an CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten, was (bei einem etwa gleich hohen CD4<sup>+</sup>-Anteil) zu einem kleineren CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Verhältnis bei diesen Tieren führte (Abb.

4). Diese Verminderung des CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Verhältnisses wurde ebenso in anderen Untersuchungen beschrieben (GREELEY et al., 1996; BYRNE et al., 2000 A; STRASSER et al., 2000; FALADYNA et al., 2001). Im Gegensatz zu diesen Veröffentlichungen konnten wir jedoch keinen geringeren Anteil an CD4<sup>+</sup>-Zellen bei älteren Tieren erkennen. Da bei den verschiedenen Rassen altersbedingte Veränderungen unterschiedlich spät einsetzen, ist es denkbar, dass sich die Einflüsse von Rasse und Alter bei den von uns ermittelten Werten nicht trennen lassen.

Analog zur Studie von BYRNE et al. (2000 a) verteilten sich auch die von uns gemessenen prozentualen Anteile der B-Zellen bei gesunden Katzen über einen weiteren Wertebereich als bei den untersuchten Hunden. Nach der statistischen Auswertung der Daten wurde der Referenzbereich aufgrund der Normalverteilung erstellt. Dabei wurden der Mittelwert und die Standardabweichung berücksichtigt. Wir haben im Weiteren als Referenzbereich den jeweiligen Mittelwert  $\pm$  eine Standardabweichung angenommen.

Zusätzlich zur Untersuchung von Blutproben gesunder Hunde und Katzen zur Erstellung eines Referenzbereiches haben wir versucht, die in der Literatur beschriebenen Veränderungen in den Lymphozyten-subpopulationen bei FIV-infizierten Katzen nachzuvollziehen (ACKLEY et al., 1990; NOVOTNEY et al., 1990; BISHOP et al., 1992; HOFFMANN-FEZER et al., 1992; WALKER et al., 1994; HOFFMANN-FEZER et al., 1996; HOFFMANN-LEHMANN et al., 1997).

Kennzeichnend für die Pathogenese der FIV-Infektion ist eine Störung der normalen Funktion des Immunsystems. Sowohl nach experimenteller, als auch nach natürlicher Infektion wird eine Abnahme der CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten beobachtet. Der Verlust an CD4<sup>+</sup>-Zellen beeinträchtigt das Immunsystem, da diese Zellen eine wichtige Rolle bei der zellvermittelten und der humoralen Immunantwort haben. Ähnlich, wie dies bei der HIV-Infektion beim Menschen beobachtet wird, führt der Verlust von CD4<sup>+</sup>-Zellen zur Inversion des CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Quotienten. Diese Inversion kann Wochen bis Monate nach der Infektion auftreten. Imanchen Fällen verstärkt auch ein Anstieg der CD8<sup>+</sup>-Zellen diesen Effekt (BENDINELLI et al., 1995; SELLON, 1998).

Die von uns untersuchten FIV-Antikörper-positiven Katzen zeigten unterschiedliche klinische Symptome bzw. waren zum Teil auch klinisch unauffällig und befanden sich daher zum Zeitpunkt der Untersuchung in unterschiedlichen Stadien der FIV-Infektion. Ein deutlicher Abfall der CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten ist im Verlauf der FIV-Infektion vor allem in den terminalen Stadien zu erwarten (ACKLEY et al., 1990; HOFFMANN-LEHMANN et al., 1997). Bei den von uns untersuchten FIV-positiven Katzen lagen die Anteile der CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten deutlich unter den Werten der FIV-negativen

Vergleichsgruppe (Tab. 4 und Abb. 5). Ähnliche Anteile an CD4<sup>+</sup>-Zellen wurden auch von WALKER et al. (1994) bei FIV-Antikörper-positiven Katzen ohne Einteilung in klinische Stadien als auch von VAHLENKAMP et al. (1996) bei experimentell infizierten, klinisch gesunden Tieren gemessen.

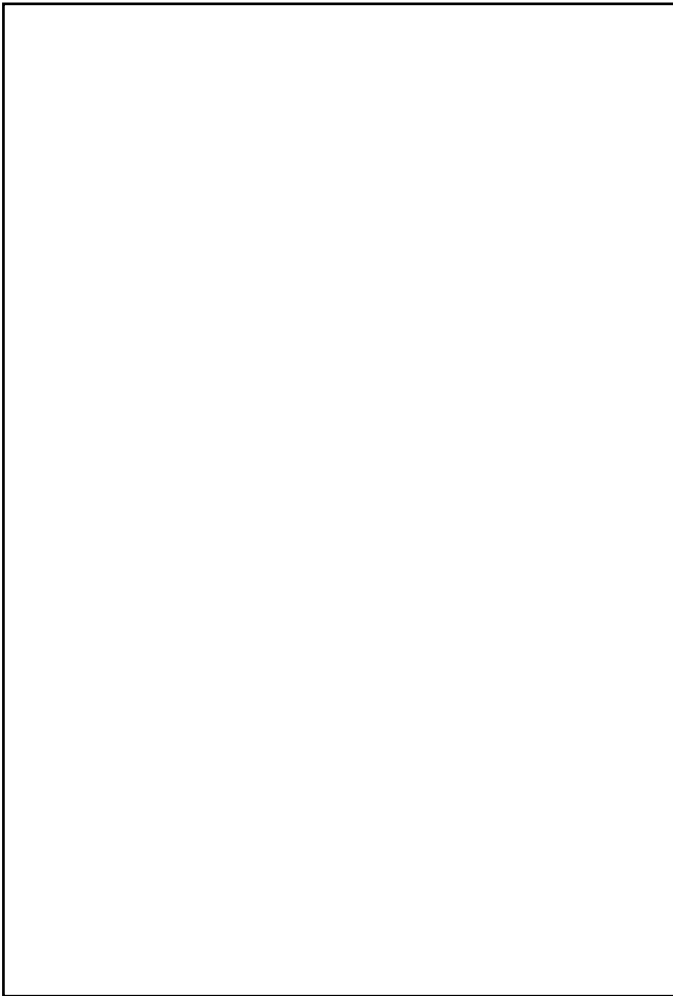
Wir konnten im Rahmen dieser Studie auch mit unter Praxisbedingungen gewonnenen Blutproben und bei unterschiedlichen Rassen die in der Literatur beschriebenen Referenzbereiche und die Veränderungen bei FIV-positiven Katzen nachvollziehen. Auf dieser Grundlage ist es nun möglich, auch Tiere mit veränderten Werten zu identifizieren und Veränderungen zu interpretieren. Folgende Anwendungsgebiete zeichnen sich ab: eine objektivierbare Verlaufskontrolle der Therapie von FIV-positiven Katzen ist denkbar. Auch beim Hund kommt der Erstellung des Immunstatus bei verschiedenen Erkrankungen eine besondere Bedeutung zu. Bei der generalisierten Demodikose wird schon seit längerem als Ursache ein Defekt der zellulären Immunantwort vermutet. Die Erstellung eines Immunstatus kann hier die T-Zellsuppression nachweisen.

Die Dysfunktion der T-Helferzellen bei Schäferhunden mit Pyodermie (GSP) spiegelt sich auch in den Lymphozytenzahlen im peripheren Blut wider: das CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Verhältnis ist aufgrund des Anstieges der CD8<sup>+</sup>-Zellen verändert und es finden sich deutlich weniger B-Zellen.

Die geringe Inzidenz und das vielgestaltige klinische Bild beim systemischen Lypus erythematodes (SLE) erschweren die Diagnosestellung, so dass der Labordiagnostik hier besondere Bedeutung zukommt. Neben dem Nachweis von Antinukleären Antikörpern (ANA) lässt sich mittels Durchflusszytometrie bei Hunden mit SLE eine deutliche Abnahme der CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten (unter 200 Zellen/ $\mu$ l) zeigen. Der CD8<sup>+</sup>-Abfall ist umso stärker, je schwerer das Krankheitsbild ausgeprägt ist. Das CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Verhältnis ist trotz einer leichten Abnahme der CD4<sup>+</sup>-Zellen, aufgrund des starken Abfalls der CD8<sup>+</sup>-Zellen, zu den CD4<sup>+</sup>-Zellen verschoben (Ratio CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> >4,0).

Die durchflusszytometrische Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen ist deshalb auch bei der Kontrolle der Therapie des SLE beim Hund eine wichtige Hilfe. Ein deutlicher Anstieg der CD8<sup>+</sup>-Zellen über 200 Zellen ist mit einem guten Ansprechen auf die Therapie verbunden. Tiere, die auf die Therapie nicht ansprechen, zeigen keine deutlichen Veränderungen dieses Parameters. Steigt die Zahl der CD8<sup>+</sup>-Zellen im Laufe der Therapie nicht schnell über diesen Schwellenwert, sollte ein Therapiewechsel erwogen werden.

Nach Auswertung erster Daten bezüglich der Pyodermie und Demodikose zeigte sich, dass der Immunstatus bei diesen Erkrankungen relevant ist. Da wir



bisher leider nur wenige Daten innerhalb der Routine-diagnostik ermitteln konnten, müssen diese ersten Beobachtungen durch weitere Untersuchungen und Studien bestätigt werden.

Auch bei angeborenen Immundefekten bei Hund und Katze könnte die Untersuchung des Immunstatus pathogenetische Hinweise liefern und damit eine prognostische Hilfe sein.

#### Danksagung

Unser Dank gilt insbesondere den Kollegen Tanja Kreylos vom Tierheim Eichenhof in Vlotho, Dr. Claus Lekschas, Stadtlauringen, und Dr. Susann-Yvonne Mihaljevic von der Tierärztlichen Fachklinik in Ravensburg für ihre Unterstützung mit Probenmaterial und Patientendaten.

#### Literatur

**ABBAS, A. K.**, A. LICHTMAN und J. POBER (1996): Immunologie. Ins Deutsche übersetzt von B. M. Stadler und M. Hess. Bern: Hans Huber Verlag. w **ACKLEY, C. D.**, J. K. YAMAMOTO, N. LEVY, N. C. PEDERSEN und M. D. COOPER (1990): Immunologie Abnormalities in Pathogen-Free Cats Experimentally Infected with Feline Immunodeficiency Virus. *J. Virol.* **64**, 5652-5655. w **ACKLEY, C. D.**, und M. D. COOPER (1992): Characterization of a feline T-cell-specific monoclonal antibody reactive with a CD5-like molecule. *Am. J. Vet. Res.* **4**, 466-471. w **ENDINELLI, M.**, M. PISTELLO, S. LOMBARDI, A. POLI, C. GARZELLI, D. MATTEUCCI, L. CECCHERINI-NELLI, G. MALVALDI und F. TOZZINI (1995): Feline Immunodeficiency Virus: an Interesting Model for AIDS Studies and an Important Cat Pathogen. *Clin.*

*Microbiol. Rev.* **8**, 87-112. w **BISHOP, S. A.**, N. A. WILLIAMS, T. J. GRUFFYDD-JONES, D. A. HARBOUR und C. R. STOKES (1992): An early defect in primary and secondary T cell responses in asymptomatic cats during acute feline immunodeficiency virus (FIV) infection. *Clin. Exp. Immunol.* **90**, 491-496. **BYRNE, K. M.**, K. HONG WOOK, P. C. BOON, G. A. REINHART und M. G. HAYEK (2000 a): A standardized gating technique for the generation of flow cytometry data for normal canine and normal feline blood lymphocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **73**, 167-182. w **BYRNE, K. M.**, G. A. REINHART und M. G. HAYEK (2000 b): Standardized flow cytometry gating in veterinary medicine. *Meth. Cell Sci.* **22**, 191-198. w **CASWELL, J. L.**, J. A. YAGER, W. M. PARKER und P. F. MOORE (1997): A prospective study of the immunophenotype and temporal changes in the histologic lesions of canine demodicosis. *Vet. Pathol.* **34**, 279-287. w **CHABANNE, L.**, T. MARCHAL, P. DENEROLLE, J. P. MAGNOL, C. FOURNEL, J. C. MONIER und D. RIGAL (1995): Lymphocyte subset abnormalities in German shepherd dog pyoderma (GSP). *Vet. Immunol. Immunopathol.* **49**, 189-198. w **DEAN, G. A.**, S. L. QUACKENBUSH, C. D. ACKLEY, M. D. COOPER und E. A. HOOVER (1991): Flow cytometric analysis of T-Lymphocyte subsets in cats. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **28**, 327-335. w **FALDYNA, M.**, L. LEVÄ, P. KNÖTIGOVÁ und M. TOMAN (2001): Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs - a flow cytometric study. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **82**, 23-37. w **FRANZ, M.** (1996): Durchflusszytometrische Untersuchungen von Lymphozytensubpopulationen bei gesunden und kranken Hunden. Diss. Vet. med. Fak., München. w **GREELEY, E. H.**, R. D. KEALY, J. M. BALLAM, D. F. LAWLER und M. SEGRE (1996): The influence of age on the canine immune system. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **55**, 1-10. w **HOFFMANN-FEZER, G.**, J. THUM, C. ACKLEY, M. HERBOLD, J. MYSLIWITZ, S. THEFELD, K. HARTMANN und W. KRAFT (1992): Decline in CD4<sup>+</sup> cell numbers in cats with naturally acquired feline immunodeficiency virus infection. *J. Virol.* **66**, 1484-1488. w **HOFFMANN-FEZER, G.**, W. MORTELBAUER, K. HARTMANN, J. MYSLIWIETZ, S. THEFELD, B. BEER, I. THUM und W. KRAFT (1996): Comparison of T-cell subpopulations in cats naturally infected with feline leukemia virus or feline immunodeficiency virus. *Res. Vet. Sei.* **61**, 222-226. w **HOFMANN-LEHMANN R.**, E. HOLZNAGEL, P. OSSENT und H. LUTZ (1997): Parameters of Disease Progression in Long-Term Experimental Feline Retrovirus (Feline Immunodeficiency Virus and Feline Leukemia Virus) Infections: Hematology, Clinical Chemistry, and Lymphocyte Subsets. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* **4**, 33-42. w **JUNGI, T. W.** (2000): Immundefekte. In: JUNGI, T. W. (Hrsg.). *Klinische Veterinärimmunologie*, Enke Verlag, Stuttgart. w **NOVOTNEY, C. R.**, V. ENGLISH, J. HOUSMAN, M. G. DAVIDSON, M. P. NASISSE, C.-R. JENG, W. C. DAVIS und M. B. TOMPKINS (1990): Lymphocyte population changes in cats naturally infected with feline immunodeficiency virus. *AIDS* **4**, 1213-1218. w **QUACKENBUSH, S. L.**, P. R. DONAHUE, G. A. DEAN, M. H. MYLES, C. D. ACKLEY, M. D. COOPER, J. I. MULLINS und E. A. HOOVER (1990): Lymphocyte subset alterations and viral determinants of immunodeficiency disease induction by the feline leukemia virus FeLV-FAIDS. *J. Virol.* **64**, 5465-5474. w **SELLON, R. K.** (1998): Feline Immunodeficiency Virus Infection. In: GREEN (Hrsg.): *Infectious disease of the dog and cat*. W. B. Saunders Company, Philadelphia. w **STRASSER, A.**, A. TELTSCHER, B. MAY, C. SANDERS und H. NIEDERMÜLLER (2000): Age-associated changes in the immune system of German shepherd dogs. *J. Vet. Med. A* **47**, 181-192. w **TOMAN, M.**, M. FALDYNA, P. KNÖTIGOVA, D. POKOROVA und J. SINKORA (2002): Postnatal development of leukocyte subset composition and activity in dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **87**, 321-326. w **VAHLENKAMP, T. W.**, A. DE RONDE, M. C. HORZINEK und H. F. EGBERINK (1996): Quantifizierung feliner Immunschwächevirus (FIV) RNS im Plasma infizierter Katzen. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **109**, 265-269. w **WALKER, C.**, P. J. CANFIELD und D. N. LOVE (1994): Analysis of leucocytes and lymphocyte subsets for different clinical stages of naturally acquired feline immunodeficiency virus infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **44**, 1-12. w **WINNICKA, A.**, D. JAGIELSKI, M. HOFFMANN-JAGIELSKA und R. LECHOWSKI (2002): Cytometric Evaluation of Peripheral Blood Lymphocytes in Dogs with Lymphoma during Chemotherapy. *J. Vet. Med. A* **49**, 303-306.

#### Anschrift der Verfasser:

Dr. Ines Langbein, Laboklin GmbH & Co. KG, Prinzregentenstraße 3, D-97688 Bad Kissingen, Tel. (09 71) 72 36-5 53, E-Mail: langbein@laboklin.de