

Aus der
Medizinischen und Gerichtlichen Veterinärklinik;
Innere Medizin der Kleintiere und Klinische
Laboratoriumsdiagnostik
und dem
Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Durchflußzytometrische Analyse von
Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut
von Hunden mit immunsuppressiven
Erkrankungen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Jan Bokemeyer

Gießen 2003

Aus der
Medizinischen und Gerichtlichen Veterinärklinik;
Innere Medizin der Kleintiere und Klinische
Laboratoriumsdiagnostik (HDoz Dr. Andreas Moritz)

und dem
Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
(Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer)
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Durchflußzytometrische Analyse von
Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut
von Hunden mit immunsuppressiven
Erkrankungen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Jan Bokemeyer
Tierarzt aus Frankfurt

Gießen 2003

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann

1. Berichterstatter: HDoz Dr. A. Moritz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Tag der mündlichen Prüfung: 07. März 2003

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	SCHRIFTTUM	2
2.1	Allgemeines zur Bestimmung von Leukozytensubpopulationen im peripheren Blut	2
2.1.1	Geschichtliche Entwicklung	2
2.1.2	Leukozytenoberflächenantigene des Hundes	2
2.1.2.1	caCD 5-Antigen	3
2.1.2.2	caCD 4-Antigen	4
2.1.2.3	caCD 8-Antigen	5
2.1.2.4	caCD 21(like)-Antigen	5
2.1.3	Lymphozytensubpopulationen des Hundes	6
2.2	Ausgewählte Erkrankungen des Hundes, die mit Veränderungen im Immunstatus einhergehen	9
2.2.1	Parvovirose	9
2.2.2	Hyperadrenokortizismus	11
2.2.3	Leishmaniose	13
3	MATERIAL UND METHODEN	16
3.1	Untersuchungsgut	16
3.1.1	Kontrollgruppen 1 und 2 (Beagle-Gruppen)	17
3.1.2	Kontrollgruppe 3 (Welpengruppe)	18
3.1.3	Kontrollgruppe 4 (Adulte Gruppe)	20
3.1.4	Patientengruppe 1 (Parvovirose-Gruppe)	20
3.1.5	Patientengruppe 2 (Morbus Cushing-Gruppe)	20
3.1.6	Patientengruppe 3 (Leishmaniose-Gruppe)	22
3.1.7	Patientengruppe 4 (Gruppe mit anderen Erkrankungen)	23
3.2	Bestimmung der Lymphozytenanzahl	25
3.3	Blutpräparation	25
3.4	Durchflußzytometrie	28
3.5	Vorversuche und Geräteevaluierung	29
3.6	Lagerungsversuch	29
3.7	Statistische Auswertung	29
4	ERGEBNISSE	31
4.1	Differenzierung der Leukozyten	31

4.1.1	Nachweis von CD4, CD8 und CD21	32
4.1.2	Nachweis von CD 5	32
4.2	Kontrollgruppe 1	36
4.3	Lagerungsversuch	36
4.4	Vergleich der Kontrollgruppen 2, 3, 4	38
4.5	Vergleich der Kontrollgruppen mit den Patientengruppen	39
4.5.1	Kontrollgruppe 3 (Welpengruppe) vs. Patientengruppe 1 (Parvovirose-Gruppe)	39
4.5.2	Kontrollgruppe 4 (Adulte Gruppe) vs. Patientengruppe 2 (Morbus Cushing-Gruppe)	42
4.5.3	Kontrollgruppe 4 (Adulte Gruppe) vs. Patientengruppe 3 (Leishmaniose-Gruppe)	42
4.6	Patientengruppe 4 (Andere Erkrankungen)	45
5	DISKUSSION	47
5.1	Durchflußzytometrie.....	47
5.2	Antigene	48
5.2.1	CD5-Antigen	48
5.2.2	CD4-Antigen, CD8-Antigen, CD21-Antigen	49
5.3	Streuungszerlegung.....	50
5.4	Lagerungsversuch	51
5.5	Vergleich Kontrollgruppe 2 (Beaglegruppe) vs. Kontrollgruppe 3 (Adulte Gruppe)	51
5.6	Vergleich der Kontrollgruppen mit den Patientengruppen	52
5.6.1	Kontrollgruppe 3 (Welpengruppe) vs. Patientengruppe 1 (Parvovirose-Gruppe)	53
5.6.2	Kontrollgruppe 4 (Adulte Gruppe) vs. Patientengruppe 2 (Morbus Cushing-Gruppe)	54
5.6.3	Kontrollgruppe 4 (Adulte Gruppe) vs. Patientengruppe 3 (Leishmaniose-Gruppe)	54
5.7	Diagnose und Prognose am Einzeltier.....	55
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	57
7	SUMMARY	59
8	SCHRIFTTUMVERZEICHNIS	61
9	DANKSAGUNG.....	74

Abkürzungsverzeichnis

Im Text verwendete Abkürzungen

abs.	=	absolut
ACTH	=	Adrenocorticotropes Hormon
ALT	=	Alanin-Amino-Transferase
bzw.	=	beziehungsweise
CD	=	Cluster of differentiation
CDabs.	=	Zellzahl errechnet für das jeweilige Antigen
et al.	=	et alii
FITC	=	Fluoreszein-Isothiozyanat
GLDH	=	Glutamat-Dehydrogenase
h	=	Stunden (<i>hours</i>)
H*1	=	Technicon H*1
Ig	=	Immunglobulin
IL	=	Interleukin
IFN	=	Interferon
J.	=	Jahre
K ₃ EDTA	=	Kalium-Ethylendiamintetraessigsäure
KM	=	Knochenmark
MHC	=	<u>Major Histocompatibility Complex</u>
mAk	=	monoklonale Antikörper
n	=	Probenzahl
Na	=	Natrium
n. b.	=	nicht bestimmt
PBS	=	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PE	=	R-Phycoerythrin
s	=	Standardabweichung
TNF	=	Tumor-Nekrose-Faktor
u.a.	=	unter anderem
μl	=	Mikroliter
vs.	=	versus
$\bar{x}$	=	Mittelwert

1 EINLEITUNG

Die immunologische Differenzierung von Leukozyten in einzelne Subpopulationen erfolgt anhand von Membranantigenen, die je nach Differenzierungs- oder Aktivierungsstadium exprimiert werden. Die Entwicklung von monoklonalen Antikörpern gegen diese Antigene führte zu einem neuen Verständnis der Immunabwehr und damit verbundener Erkrankungen. Die exakte Differenzierung dieser Blutzellen hat darüber hinaus auch Anwendung in der klinischen Routine gefunden. Um die Orientierung bei der Nutzung von monoklonalen Antikörpern gegen leukozytäre Differenzierungsantigene zu erleichtern, wurde eine systematische Nomenklatur, das CD (Cluster of Differentiation) System (BERNARD und BOUMSELL, 1984), eingeführt. In Verbindung mit diesen spezifischen Antikörpern hat sich die Durchflußzytometrie als sehr effiziente Technik in der analytischen Zytologie erwiesen. Ihre Vorteile liegen in der raschen Messung und Differenzierung von Zellsuspensionen und der Möglichkeit der statistischen Auswertung der gewonnenen Daten.

Nach Übertragung des humanen CD-Systems auf einige Tierarten im Jahr 1989 (Rinder (BoCD), Schafe (OvCD) und Ziegen (CpCD)) wurden 1994 auf dem 1. Workshop für canine Leukozyten-Oberflächenantigene (CLAW) auch Antikörper für den Hund entsprechend der humanmedizinischen CD-Nomenklatur gruppiert und benannt (COBBOLD und METCALFE, 1994; SCHUBERTH et al., 1991). Bislang ist jedoch wenig über die Zusammensetzung der Leukozyten im peripheren Blut von gesunden wie auch erkrankten Hunden bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, unter Anwendung eines einfachen und schnellen Verfahrens zur Blutpräparation, Leukozytensubpopulationen im peripheren Blut des Hundes mit Hilfe der Durchflußzytometrie zu quantifizieren. Anhand der Ergebnisse sollte ermittelt werden, ob es bei infektiösen bzw. immunsuppressiven Erkrankungen zu Veränderungen und Besonderheiten in der Zusammensetzung der Lymphozytensubpopulationen kommt, die diagnostische und/oder prognostische Verwertbarkeit für klinische Einzelpatienten besitzen. Proben von Tieren, die an Parvovirose, Leishmaniose und Hyperadrenokortizismus erkrankt waren, wurden in Gruppen zusammengefaßt und mit verschiedenen klinisch gesunden Kontrollgruppen verglichen.

2 SCHRIFTTUM

2.1 Allgemeines zur Bestimmung von Leukozytensubpopulationen im peripheren Blut

2.1.1 Geschichtliche Entwicklung

Für Leukozytensubpopulationen charakteristische Oberflächenantigene sind, neben den T- und B-Zellrezeptoren, im wesentlichen Differenzierungs- und Transplantationsantigene. Sie geben uns die Möglichkeit bestimmte Subpopulationen von Zellen genauer zu unterscheiden, als dies aufgrund rein morphologischer Kriterien möglich ist. In der Humanmedizin wird die Differenzierung von Zellen aufgrund von unterschiedlichen CD-Antigenen bereits in der Routinediagnostik eingesetzt. Besonders die Phänotypisierung von Lymphozyten im peripheren Blut ist inzwischen eine gebräuchliche Anwendung. Im Rahmen einer HIV-Infektion zum Beispiel besitzt die Anzahl CD4+ Zellen diagnostische, prognostische und therapeutische Aussagekraft. Wiederholt stark erniedrigte CD4+ Zellzahlen bei ansonsten unauffälligen Patienten sprechen für eine fortgeschrittene HIV-Infektion. Schnell abfallende oder sehr niedrige CD4+ Zellzahlen deuten auf eine Progression der Erkrankung hin (DANIEL, 1992). Gewisse Moleküle im Rahmen der Immundiagnostik auf der Zelloberfläche nachzuweisen, hat auch schon in der Veterinärmedizin erheblich an Bedeutung gewonnen (SCHUBERTH et al., 1991; BYRNE et al., 2000). Schon 1991 zeigten HOFFMANN-FEZER et al., daß auch eine FIV-Infektion der Katze, ähnlich der HIV-Infektion des Menschen, zu einer Reihe von quantitativen Veränderungen der T-Lymphozyten-Subpopulationen führt. So erfüllt die FIV-Infektion eine Reihe von Kriterien eines für AIDS geeigneten Tiermodells (HOFFMANN-FEZER et al., 1991).

2.1.2 Leukozytenoberflächenantigene des Hundes

Während bei verschiedenen Spezies wie Mensch, Maus, Ratte, Schwein und Rind eine Reihe monoklonaler Antikörper gegen Leukozytendifferenzierungsantigene genau definiert sind, standen bis vor kurzer Zeit beim Hund lediglich lymphozytenspezifische, kreuzreagierende poly- oder monoklonale Antikörper (mAk) anderer Spezies zur Verfügung (GREENLEE et al., 1987; SCHUBERTH et al., 1991;

JACOBSEN et al., 1993; CHABANNE et al., 1995; GALKOWSKA et al., 1996; SCHUBERTH et al., 1996). Die genaue Analyse des detektierten Antigens, einschließlich Molekulargewicht und funktionelle Charakteristik der exprimierenden Zelle, muß für die meisten Antikörper erst erforscht werden. Dies ist notwendig, um mit Sicherheit sagen zu können, daß auch beim Hund das Equivalent, welches bei der ursprünglichen Tierart definiert wurde, erkannt wird (BYRNE et al., 2000). Die ersten verfügbaren hundespezifischen mAK wurden auf dem „first canine leukocyte antigen workshop (CLAW)“ charakterisiert und an die humanmedizinische CD- („cluster of differentiation“) Nomenklatur angepaßt (COBBOLD und METCALFE, 1994). Die Anzahl dieser ist jedoch begrenzt und nur wenige mAK sind kommerziell erhältlich. Die in dieser Arbeit verwendeten mAK und die von ihnen erkannten Antigene CD5, CD4, CD8 und CD21 sind auf dem „first canine leukocyte antigen workshop“ charakterisiert worden.

2.1.2.1 caCD 5-Antigen

Das CD5-Oberflächenglykoprotein wird beim Menschen von der Mehrzahl der T-Zellen und einer Minderheit von B-Zellen (B1-Zellen) exprimiert (ARBER und WEISS, 1995). Die genaue Rolle CD5+ B-Zellen ist noch nicht eindeutig geklärt. Es wird vermutet das das CD5-Antigen verschiedene Funktionen bei unterschiedlichen B-Zell Subpopulationen ausübt. Stimulation durch CD5-spezifische Antikörper können gleichermaßen zu Apoptose wie auch zur Proliferation verschiedener B-Zellen führen (YOUINOU et al., 1999). Das CD5-Molekül auf der Oberfläche von T-Zellen scheint eine Reihe von Aufgaben zu besitzen (BIKAH et al., 1998). Gesichert ist die Beteiligung an der Thymozyten-Reifung, T-Zell-Interaktion und der CD3-Antigen-abhängigen T-Zell-Stimulation. Der natürliche Ligand für das CD5-Antigen ist CD72, welches auf B-Zellen zu finden ist und dort bestimmte Signalabläufe induziert. Alternative Liganden, die in andere Aspekte der T-Zell-Biologie involviert sind, werden vermutet und zur Zeit noch untersucht (CALVO et al., 1999).

Der von uns verwendete Ratten-monoklonale Antikörper (Ratten-mAK) gegen das caCD5-Antigen (Klon: 17-4-8) gehört der Subklasse IgG2a an (COBBOLD und METCALFE, 1994). Beim Hund reagieren anti-CD5 mAk spezifisch mit T-Zellen und werden von COBBOLD UND METCALFE (1994), gegenüber dem anti-caTHY-1 mAk, als T-Zell Marker bevorzugt (COBBOLD und METCALFE, 1994, MCKENZIE und FABRE, 1981). Nur CHABANNE et al. erwähnen die Existenz CD5-Antigen

präsentierender B-Zellen im peripheren Blut auch beim Hund (CHABANNE et al., 1995). Bei durchflußzytometrischen Untersuchungen zeigen 75% der Lymphozyten im peripheren Blut eine Bindung mit diesem Antikörper (VOSS, 1995).

2.1.2.2 caCD 4-Antigen

Das CD4-Antigen wird als Marker einer T-Zell-Subpopulation angesehen, ist jedoch bei Mensch und Ratte auch auf Monozyten, Makrophagen und eosinophilen Granulozyten zu finden (LUCEY et al., 1989). CD4+-Zellen werden als T-Helferzellen (Th-Zellen) angesprochen, die sich nachweislich bei Mensch, Ratte und Maus in zwei Subpopulationen (Th1- und Th2-Zellen) aufteilen lassen. Th1- und Th2-Zellen lassen sich anhand der von ihnen sezernierten Zytokine unterscheiden. Während die von Th1-Zellen produzierten Zytokine eine inflammatorische Wirkung haben und hauptsächlich auf Makrophagen wirken, gelten die Zytokine der Th2-Zellen als immunmodulierend und steigern die Proliferation von Eosinophilen und Mastzellen, wie auch die Produktion von Antikörpern (CARTER und DUTTON, 1996). Daneben sollen auch noch CD4+-Zellen mit zytotoxischer Wirkung existieren (HAHN et al., 1995). Durch die Fähigkeit verschiedene Vorgänge zu verstärken, wie auch zu hemmen haben CD4+-Zellen eine zentrale Stellung in der Regulation einer Immunreaktion (FRASCA et al., 1998).

Der von uns verwendete Ratten-mAk (Klon YKIX302.9.3.7) gegen das caCD4-Antigen gehört der Subklasse IgG2a an und erkennt ein Antigen welches ein Molekulargewicht von 55 kDa hat. Beim Hund stabilisiert dieses Oberflächenglykoprotein als T-Zell-Korezeptor die Interaktion mit Haupthistokompatibilitätskomplexantigen Klasse II (MHC Klasse II)-tragenden Zellen, ähnlich wie auch bei anderen Spezies (COBBOLD und METCALFE, 1994; WÜNSCHMANN, 1996; MILDE et al. 1993). Auf reifen T-Zellen werden beim Hund, ähnlich wie beim Menschen, die CD4- und CD8-Antigene nicht gemeinsam exprimiert (GEBHARD und CARTER, 1992). Eine Besonderheit stellt die starke Expression des kaninen CD4-Moleküls auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten dar (GEBHARD und CARTER, 1992).

2.1.2.3 caCD 8-Antigen

Dieses Antigen, das bei Mensch und Maus gewöhnlich in der Form eines $\alpha\beta$ -Heterodimers vorliegt, bindet an die nicht polymorphe Region des MHC Klasse I und stabilisiert als T-Zell-Korezeptor den Zellkontakt von zytotoxischen T-Zellen mit MHC Klasse I exprimierenden Zellen (GARCIA et al., 1996). Durch Blockade des CD8-Antigens mittels entsprechendem Antikörper kann die Konjugation von zytotoxischen Zellen mit MHC Klasse I-Zielzellen verhindert werden. Inzwischen weiß man jedoch, daß CD8+-Zellen nicht nur als zytotoxische Zellen angesehen werden dürfen, sondern eine Reihe weiterer Funktionen besitzen. So können einige dieser Zellen aufgrund der von ihnen sezernierten Zytokine die Immunantwort in ähnlicher Weise steuern, wie es bis jetzt nur von CD4+-Zellen bekannt ist (KEMENY et al., 1994; CARTER und DUTTON, 1996).

Der von uns verwendete Maus-mAK (Klon: Dog 10-1-1 syn. M10) richtet sich gegen das caCD8-Antigen und gehört der Subklasse IgG1 an. Das von ihm erkannte Antigen hat unter nicht reduzierenden bzw. reduzierenden Bedingungen ein Molekulargewicht von 76 bzw. 33 kDa (VOSS et al., 1993). Er ist spezifisch für die α -Kette des caninen CD8-Antigens (COBBOLD und METCALFE, 1994). Das caCD8 Oberflächenglykoprotein wird ausschließlich von einer T-Lymphozyten-Subpopulation exprimiert und kommt auf reifen Zellen nicht gemeinsam mit dem caCD4-Antigen vor (GEBHARD und CARTER, 1992). Die Anzahl caCD8- zu caCD4 positiver Zellen liegt im peripheren Blut gesunder Hunde in einem Verhältnis von ca. 1 zu 2 vor (GEBHARD und CARTER, 1992; CHABANNE et al., 1995). In ersten durchflußzytometrischen Untersuchungen bindet dieser Antikörper an 26 % der Lymphozyten des peripheren Blutes (VOSS et al., 1993).

2.1.2.4 caCD 21(like)-Antigen

Das CD21-Antigen des Menschen ist ein 145 kDa Glykoprotein der Komplement-Rezeptor-Familie. Es wird von reifen B-Zellen exprimiert und es wird vermutet das es neben seiner Funktion als Komplement-Rezeptor eine wichtige Rolle bei der B-Zell-Immunantwort spielt (TEDDER et al.1994). Der Ligand für das CD21-Antigen ist der Komplement-Faktor C3d, welcher angehängt an Antigene nach Aktivierung des

Komplementsystems auftritt. Eine weitere Rolle des Ko-Rezeptors CD21 liegt in der Regulation der humoralen Abwehr durch Aktivierung der B-Zellen mittels Signal-Transduktion (CARROLL, 1998).

Der Maus-mAK (KlonCA2.1D6) gegen das caCD21-Antigen, der in unseren Untersuchungen eingesetzt wurde, gehört der IgG1-Fraktion an. Auf dem „first canine leukocyte antigen workshop“ konnte das Molekulargewicht des Epitops jedoch nicht genau bestimmt werden, so daß darauf verzichtet wurde, es als CD21-Antigen anzusprechen. Stattdessen einigte man sich auf die Bezeichnung CD21(like)-Antigen (COBBOLD und METCALFE, 1994). Der Antikörper erkennt B-Zellen und wurde bereits mehrfach in der Literatur als Marker dieser Zellpopulation verwendet (CANIATTI et al., 1996; ARLIAN et al., 1997; BOURDOISEAU et al., 1997; CASWELL et al., 1997).

2.1.3 Lymphozytensubpopulationen des Hundes

Im Gegensatz zur Erforschung einzelner Antikörper ist es für die klinische Forschung notwendig Vergleichswerte zu besitzen, um den immunologischen Status eines einzelnen Patienten oder einer Patientengruppe zu bestimmen (BYRNE et al., 2000). Das Problem aller bisherigen Studien bestand in einem Mangel an Vergleichswerten über eine Normalverteilung der Lymphozyten im Blut gesunder Hunde. Für klinische Untersuchungen wurden deshalb meist eigene Referenzwerte mit gesunden Tieren ermittelt, damit sie anschließend mit den erkrankten Tieren verglichen werden können (CHABANNE et al., 1995; CHABANNE et al., 1995; DIRSCHERL et al., 1995; BOURDOISEAU et al., 1997). Um eine Zusammenfassung der wichtigsten Subpopulationen der bis heute von verschiedenen Gruppen erhaltenen Ergebnisse bemühten sich FALDYNA (1997) und BYRNE et al. (2000). In Anlehnung der dortigen Ergebnisse ist in der Tabelle 1 eine Auswahl dargestellt.

Die Messung der Lymphozytensubpopulationen erfolgte bei allen Autoren aus der mononukleären Fraktion des Blutes, welche mittels Dichtegradienten-Separation gewonnen wurde. Erst BYRNE et al. (2000) versuchten zusätzlich eine Darstellung durch direkte Vollblutlyse, indem sie ein kommerziell erhältliches Blutlysereagens aus der Humanmedizin verwendeten. Unterschiedliche Ergebnisse zwischen diesen beiden Isolationstechniken konnten nicht festgestellt werden. Weitere Studien zur Absicherung wurden jedoch von ihnen empfohlen (BYRNE et al., 2000). FALDYNA

et al. (2001) fanden bei der Untersuchung von 12 Hunden ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen einer Vollblutlyse und der Messung nach einer Dichte-Gradienten-Zentrifugation.

Tab. 1 Vergleich durchflußzytometrischer Analysen von peripherem Blut gesunder Hunde modifiziert nach Faldyna (1997) und Byrne (2000) (angegeben ist jeweils der prozentuale Anteil von Lymphozyten mit Mittelwert $\pm$ Standardabweichung)

Autor	CD5+	CD4+	CD8+	CD21+
GEBHARDT und CARTER (1992)		39 $\pm$ 8	18,0 $\pm$ 7,0	
MOORE et al. (1992)		46,4 $\pm$ 8,1	16,4 $\pm$ 8,8	
DISCHERL et al. (1995)	71,0 $\pm$ 10,4	40,0 $\pm$ 7,5	19,0 $\pm$ 3,6	
CHABANNE et al. (1995)	82,5 $\pm$ 4,8	47,5 $\pm$ 8,8	19,3 $\pm$ 4,0	12,2 $\pm$ 6
BYRNE et al. (2000)	83,3 $\pm$ 3,5	45,0 $\pm$ 8,3	28,8 $\pm$ 5,6	12,9 $\pm$ 3,9

Einen Einfluss des Alters auf die verschiedenen Lymphozytensubpopulationen konnten GREELY et al. (1996) zeigen. Bei einem Vergleich von jungen und alten Hunden wurden unterschiedliche B- zu T-Zell-Verhältnisse ermittelt. Junge Hunde wiesen einen größeren Prozentsatz von B-Zellen begleitet von einem reduzierten Prozentsatz von T-Zellen im peripheren Blut auf. Die erhöhten Werte von T-Zellen im Alter wurde durch vermehrt auftretende CD8+-Zellen verursacht. Als Grund dafür vermuteten die Autoren die Bildung von Gedächtnis-Zellen im Laufe des Lebens (GREELEY et al., 1996). Eine Bestätigung dieser Ergebnisse fanden FALDYNA et al. (2001) bei der Untersuchung einer Gruppe von reinrassigen Beaglen in den Altersstufen 5-6 Tage, 2 Monate, 6 Monate, 1-2 Jahre, 3-5 Jahren und >5 Jahre.

Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen waren aber nur beim Vergleich unter 6 Monate alter Tiere feststellbar.

Zusätzlich zu den altersabhängigen Unterschieden konnten auch zwischen verschiedenen Rassen (Schäferhund, Dackel, Dalmatiner, Beagle) Veränderungen hinsichtlich der Zusammensetzung der Lymphozytenfraktion nachgewiesen werden. Auch Geschlechts-abhängige Unterschiede werden diskutiert (FALDYNA et al., 2001). HOFMANN-FEZER (1992) beschrieben einen signifikant höheren Prozentsatz CD4+-Lymphozyten bei weiblichen Katzen. Für den Hund liegen noch keine gesicherten Ergebnisse vor.

In der Tumordiagnostik finden immunologische Methoden zur Charakterisierung von Leukämien und Lymphomen und zur Zuordnung anaplastischer Tumoren Anwendung (RUSLANDER et al., 1997). Der Immunphänotyp stellt bei an malignem Lymphom erkrankten Hunden einen wichtigen prognostischen Faktor dar. So können durch chemotherapeutische Intervention bei Hunden mit B-Zell-Lymphomen signifikant längere Überlebenszeiten gegenüber Hunden, die an T-Zell-Lymphomen erkrankt sind, erreicht werden (TESKE et al., 1994). Neben einer zuverlässigen Aussage zum individuellen Behandlungserfolg ermöglicht die Kenntnis des Immunphänotyps einen besseren Vergleich der Wirksamkeit verschiedener Therapieprotokolle und hilft letztendlich das Therapiemonitoring langfristig zu verbessern. Zur Differenzierung morphologisch und zytochemisch nicht sicher abgrenzbarer akuter Leukämien in der Humanmedizin wird der Immunphänotyp immer bestimmt und ist auch Grundlage der Klassifikation lymphatischer Leukämien. Die Klassifizierung caniner Leukämien beruht bisher zumeist allein auf der Beurteilung verschieden gefärbter Knochenmark- und Blutaussstriche (BRADSTOCK, 1993; BREUER et al., 1998; VERNAU und MOORE, 1999; JONES et al., 2000).

Eine erste klinische Studie, bei der Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut bestimmt wurden, erstellten CHABANNE et al. (1995) über die Pyodermie des Deutschen Schäferhundes. Dort wurde nach Vergleich mit gesunden Kontrolltieren ein früherer Verdacht erhärtet, dass eine Immunopathie ein Faktor für den Ausbruch der Krankheit ist. Es konnte gezeigt werden, daß Schäferhunde, die an einer Pyodermie litten eine, sowohl prozentual als auch absolut, erhöhte Anzahl CD8+-Zellen im peripheren Blut aufwiesen. Gleichzeitig zeigte sich eine Assoziation der Erkrankung mit einer Erniedrigung der Zahl CD21+-Zellen (CHABANNE et al., 1995).

Ähnlich der Pyodermie der Schäferhunde wurden auch bei an Leishmaniose erkrankten Hunden veränderte Lymphozytensubpopulationen gefunden (näheres siehe Kapitel 2.2) (BOURDOISEAU et al., 1997; BOURDOISEAU et al., 1997; MORENO et al., 1999). Ein verändertes Verhältnis CD4+- zu CD8+-Zellen konnte bei 3 von 4 an Ehrlichiose erkrankten Hunden nachgewiesen werden. Hier vermuteten die Autoren eine immune Dysregulation als Prädisposition für den Ausbruch einer Erkrankung (FRANK und BREITSCHWERDT, 1999). Bei einem Versuch mit 8 Hunden, die experimentell mit *Bartonella vinsonii* infiziert wurden, zeigte sich ein Anstieg des CD4/CD8-Quotienten im Verlauf der Infektion (PAPPALARDO et al., 2000). Keine signifikanten Unterschiede zeigten sich dagegen bei einer Untersuchung von CD4+- und CD8+-Zellen im Blut von Hunden mit einer Keratokonjunktivitis sicca im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren (GILGER et al., 1995).

Neben der Bestimmung von Lymphozytensubpopulationen mittels Durchflußzytometrie finden die klassifizierten Antikörper auch eine breite Anwendung bei immunhistologischen Studien. So wurden sie zum Beispiel bei Untersuchungen zu Hautveränderungen bei caniner Demodikose (CASWELL et al., 1997), Sarkoptes-Räude (ARLIAN et al., 1997) und atopischer Dermatitis (SINKE et al., 1997) angewandt. Auch verschiedene histologische Veränderungen im Gehirn von Hunden bei Staupe-Enzephalitis wurden damit immunhistologisch charakterisiert (WÜNSCHMANN, 1996; WÜNSCHMANN et al., 1999).

2.2 Ausgewählte Erkrankungen des Hundes, die mit Veränderungen im Immunstatus einhergehen

2.2.1 Parvovirose

Seitdem das canine Parvovirus (CPV) erstmals Ende der siebziger Jahre isoliert wurde, stellt es in der Hundepopulation eine der häufigsten Infektionskrankheiten der Welpen mit hoher Mortalität dar (HOUSTON et al., 1996). Es wird oronasal aufgenommen und gelangt nach einer ersten Virusvermehrung in der Schleimhaut des Nasen-Rachenraums und im retropharyngealen Lymphgewebe während einer Virämiephase in den Lymphozyten zu den Organen und Geweben des

Immunsystems. Die Replikation des Virus findet vermehrt in mitotisch aktiven Zellen statt. Eine besondere Affinität besteht zum Knochenmark, Milz, Thymus, Lymphknoten. Hier kommt es zu einer starken Virusvermehrung mit einer Beeinträchtigung der Funktion der Organe. Auch infiziert es über den Blutweg die Peyer'schen Platten in der Darmwand und gelangt von dort zu den Lieberkühn'schen Krypten, dem Ort, an dem das Darmepithel gebildet wird. Durch die starke Virusvermehrung kommt es letztlich zum Zelluntergang, der eine totale Zottenatrophie nach sich ziehen kann.

Die klinischen Symptome werden stark von Alter, bakteriellen und viralen Sekundärerregern und dem Grad der Immunsuppression mitbestimmt. Betroffen sind überwiegend Hunde im Alter von 6 Wochen bis zu 6 Monaten, besonders in den Monaten von Juli bis September (HOUSTON et al., 1996; TRUYEN, 1999). Die ersten Anzeichen einer Erkrankung sind Fieber, Mattigkeit und reduziertes Allgemeinbefinden. Durch eine hämorrhagische Jejunitis-Ileitis treten bei über 80% der erkrankten Tiere Durchfall mit gleichzeitigem Erbrechen auf (NIEMAND und SUTER, 1994). Dies führt zu einem hochgradigen Flüssigkeitsverlust und zu einem Übertritt von Darmbakterien in die Blutbahn. Der daraus resultierende Endotoxinschock ist letztlich meist die Todesursache bei der akuten Parvovirose. Gelingt es dem Hund, die Virusinfektion in den ersten 4-5 Tagen zu überleben, ist dies prognostisch günstig zu werten. Mit dem Erscheinen von Virus-neutralisierenden Antikörpern wird die Virämie beendet. Die früher noch häufiger anzutreffende Parvovirus-bedingte Myokarditis der Hundewelpen, bedingt durch eine Infektion der Junghunde in den ersten Lebenstagen, kommt heutzutage aufgrund von Impfungen der Muttertiere so gut wie gar nicht mehr vor (TRUYEN, 1999).

Histopathologisch findet sich in den Peyer'schen Platten des Darmes sowie in Lymphknoten, Milz und Thymus eine Lymphozytendepletion. Nach experimenteller Infektion kommt es erst etwa sieben Tage später zur Wiederansiedlung der Lymphozyten in den Lymphknoten (TRAUTWEIN und HEWICKER-TRAUTWEIN, 1994). Labordiagnostisch findet sich im Blut fast aller Tieren eine massive Leukopenie, besonders zwischen dem 2. und 5. Krankheitstag, die Zahl der weißen Blutkörperchen sinkt dabei mitunter auf bis zu 300 Zellen/ μ l ab (NIEMAND und SUTER, 1994). Die einhergehende Lymphopenie und transiente Immunsuppression resultiert aus der Zerstörung der Lymphozyten in den lymphatischen Organen. Im Stimulationstest mit Concanavalin A und Phythämagglutinin läßt sich bei 70 % der

erkrankten Tiere eine gestörte T-Zellreaktivität nachweisen, die auch nach überstandener akuter Phase der Primärerkrankung eine unbestimmte Zeit bestehen bleibt (OLSEN et al., 1984; TOMAN et al., 1998). Der genaue Mechanismus der herabgesetzten Stimulierbarkeit ist jedoch nicht bekannt (TRAUTWEIN und HEWICKER-TRAUTWEIN, 1994). Die beschriebene Immunsuppression führt zu einer Prädisposition für weitere Sekundärerkrankungen. Die genaue Dauer der Immunsuppression wird aber nicht beschrieben (TOMAN et al., 1998).

2.2.2 Hyperadrenokortizismus

Der Hyperadrenokortizismus, auch Morbus Cushing genannt, ist eine Endokrinopathie des Hundes, dessen Krankheitsbild durch eine chronische Hyperkortisolämie ausgelöst wird. Die Ursache des vermehrten körpereigenen Kortisols liegt einerseits in der übermäßigen Bildung des hypophysären ACTH mit einem resultierenden erhöhten Blutspiegel dieses Hormons. In zweiter Linie wird das körpereigene Kortisol durch kortisolproduzierende Tumoren der Nebennierenrinde gebildet. Für den ersten Fall, der je nach Autor ungefähr 85% der Fälle ausmacht, ist der Begriff der Pituitary-Dependent-Hypercorticism (PDH) inzwischen geläufig (NICHOLS, 1990; FELDMAN und NELSON, 1994; GRECO et al., 1999). Die hypophysären Veränderungen werden meist durch Mikro- seltener durch Makroadenome hervorgerufen. Auch diffuse oder fokale Hyperplasien ACTH-produzierender Zellen sind beschrieben (EL ETREBY et al., 1980). Kortisolproduzierende Tumoren der Nebennierenrinde führen zur Atrophie der nicht neoplastisch veränderten Anteile, sowohl an der betroffenen, als auch an der kontralateralen Nebenniere. Für diese nebennierenabhängige Form der Hyperkortisolämie wird der Begriff der Functioning-Adrenocortical-Tumor (FAT) am häufigsten benutzt (NOTHELFER und WEINHOLD, 1992; FELDMAN und NELSON, 1994). GRECO et. al (1999) beschreibt auch eine dritte Form, in der beide Veränderungen gleichzeitig beobachtet werden konnten. Die klinischen Symptome des chronischen Hyperkortisolismus sind in voller Ausprägung recht typisch. Allerdings kommt es recht selten vor, daß alle Symptome gleichzeitig auftreten. Besonders im Anfangsstadium sind die klinischen Auswirkungen oft spärlich. Auftreten können ein diffuser Haarverlust am Stamm, während Kopf und Füße zum Teil völlig behaart bleiben. Das verbliebene Haar ist lang, brüchig und sehr leicht

auszurupfen. In der Haut werden teilweise Kalkknoten beobachtet, auch erscheint sie pergamentdünn und oft kommt es durch Melanineinlagerungen zu scharf umschriebenen, dunkler pigmentierten Flecken. Durch Wasser- und Fetteinlagerungen, infolge vermehrter Natriumretention und Entgleisung des Fettstoffwechsels, wirkt der Rumpf tonnenförmig, während der Rest des Körpers durch Muskelatrophie sehr schmal erscheint (KRAFT und REUSCH, 1990). Die Atrophie von Haut, Unterhaut, Muskeln und auch Gefäßwänden entsteht durch Eiweißkatabolismus aufgrund des hohen Spiegels an Kortikosteroiden. Die Patienten neigen zu bakteriellen und viralen Infektionskrankheiten und zeigen meist eine Polydipsie, und auch –phagie, in Verbindung mit Polyurie. Labordiagnostisch findet sich in den meisten Fällen eine absolute Lymphopenie und Eosinopenie mit relativer Neutrophilie, Erythrozyten- und Thrombozytenvermehrung, zum Teil auch eine Monozytose. Charakteristisch ist eine Erhöhung der Serumspiegel von besonders der alkalischen Phosphatase, aber auch der Leberenzyme ALT und GLDH, der Glukose und des Cholesterins (NICHOLS, 1997). Hypernatriämie und Hypokaliämie ist häufig in Verbindung mit Nebennierenrindentumoren festzustellen (NICHOLS 1990; NIEMAND und SUTER, 1994).

Die Wirkung von iatrogenen Gaben von Steroidhormonen auf das Immunsystem ist ähnlich der Wirkung von körpereigenem Kortisol (SCHUYLER et al., 1984). RINKARDT et al. (1999) fanden eine veränderte Lymphozytenverteilung im peripheren Blut von Hunden nach Gaben von immunsuppressiven Dosen Prednisolons (2mg/pro kg/KM). Es kam zu einem Abfall der absoluten Zahl an Lymphozyten bzw. Erythrozyten und der Konzentration von Immunglobulinen. Aber auch der CD4/CD8-Quotient stieg aufgrund einer erniedrigten Anzahl CD8+-Zellen an (RINKARDT et al., 1999).

Beim Menschen führt die Einnahme von Prednisolon zu einer Abnahme der Zahl von Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten, wobei die prozentuale Verteilung der einzelnen Lymphozytensubpopulationen unverändert bleibt (SLADE und HEPBURN 1983; SCHUYLER et al., 1984; LUCENA, et al. 1999). Beim Morbus Cushing des Menschen zeigt sich durch eine chronische Hyperkortisolämie, im Vergleich mit gesunden Kontrollen, eine erniedrigte Prozentzahl CD4+-Zellen und eine erhöhte Prozentzahl CD8+-Zellen. Der CD4/CD8-Quotient sank bei einer Untersuchung an 20 Patienten signifikant von 2,58 auf 1,67. Für die Autoren ist ein deutlicher Zusammenhang zwischen der veränderten Zusammensetzung einzelner Lymphozytensubpopulationen und einer damit veränderten Immunregulation zu

erkennen (KRONFOL et al., 1996). Passend dazu fanden auch schon SAUER et al. (1994) eine beeinträchtigte Interleukin-2 vermittelte Lymphozytenaktivität bei Morbus Cushing-Patienten.

2.2.3 Leishmaniose

Leishmaniose ist eine Erkrankung, die sowohl beim Hund als auch beim Menschen vorkommt. Leishmanien sind begeißelte Protozoen, welche durch Sandmücken auf Säugetiere übertragen werden (BOGDAN, 1998). Die geographische Verbreitung dieser Erkrankung ist somit abhängig von ihren Insektenvektoren, in Europa von der Schmetterlingsmücke *Phlebotomus* spp.. Hunde, die durch einen Stich mit der promastigoten Form des Parasiten infiziert worden sind, müssen aber nicht zwangsläufig an einer Leishmaniose erkranken. Manche Tiere können durch eine protektive zelluläre Abwehr die Krankheit kontrollieren. Bei anderen kommt es zu einer langsam fortschreitenden progressiven Erkrankung (FERRER, 1999). In endemischen Gebieten sind bis zu 50% der seropositiven Hunde symptomlose Träger der Parasiten und stellen ein nicht erkennbares Reservoir für die Infektion anderer Hunde und des Menschen dar (FERRER, 1999). In den letzten Jahren haben sich die endemischen Gebiete und die Gesamtzahl betroffener Tiere vergrößert. Eine mögliche Erklärung dafür könnte die größere Mobilität der Hundehalter samt ihrer Hunde und eine Klimaveränderung sein, die das Überleben der Schmetterlingsmücke in immer größeren Gebieten begünstigt (NOLI, 1999). Gerade durch den gestiegenen Reiseverkehr wird die Leishmaniose auch in nicht endemischen Gebieten von immer größerer Bedeutung (SLAPPENDEL und TESKE, 1999). In Deutschland zählt sie zu den am häufigsten eingeschleppten Parasitosen des Hundes (GOTHE et al., 1997). Da die Parasiten in fast allen Teilen des Körpers zu finden sind, können die klinischen Symptome sehr vielfältig sein. Auf Grund dieser Tatsache muß diese Erkrankung bei einer Vielzahl von Krankheitsbildern in Betracht gezogen werden. Die von den Parasiten verursachten Schäden hängen von zwei Faktoren ab: die direkte Schädigung des Gewebes mit der Entwicklung von nichteitrigen, entzündlichen Läsionen (Haut, Leber, Darm, Nieren, Augen, Knochen) und die indirekten Schäden durch Ablagerung von Immunkomplexen (Nieren, Gelenke, Blutgefäße, Augen) (MORITZ et. al, 2001; NOLI, 1999). FERRER (1999) nennt die folgenden neun klinische Hauptbefunde, die sich in unterschiedlicher Häufigkeit zeigen (in Klammern die relative Prävalenz): Hautläsionen (75-89%), Lymphadenopathie (71,2-96,1%), Gewichtsverlust (30,7-70%), Anorexie (18-70%),

Augenläsionen (16-50%), Nasenbluten (10-37%), Lahmheit (4-4,6%) und Nierenversagen (16-32%). Häufige labordiagnostische Befunde sind Hyperglobulinämie (70-100%), Hypoalbuminämie (68-94%), Hyperproteinämie (63,3-91%), geringgradige Erhöhung der Leberenzymwerte (16-61%), hyporegenerative Anämie (21-94,2%), Thrombozytämie (29,3-50%), Azotämie und Kreatinämie (38-45%).

Der genaue Pathomechanismus einer Leishmaniose-Infektion ist für Mäuse relativ gut erforscht und es wird gegenwärtig versucht, die Verhältnisse auch beim Hund genauer zu verstehen. Nachdem die Parasiten durch das Insekt übertragen sind, werden sie von Makrophagen und auch von den Langerhanszellen der Haut aufgenommen, wo sie überleben und sich vermehren können. Diese Zellen verarbeiten und präsentieren parasitäres Antigen und stimulieren T-Helferzellen, die ihre Antwort gegen die Infektion richten. Zwei Subpopulationen muriner T-Helferzellen (Th-Zellen) sind identifiziert. Th1-Zellen können aufgrund der von ihnen sezernierten Zytokine Interleukin 2 (IL-2) und Interferon γ (IFN- γ) von Th2-Zellen mit den Zytokinen IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 unterschieden werden. Die Widerstandsfähigkeit gegenüber der Infektion ist abhängig von einer starken Th1-Antwort, deren Zytokine einen besonderen Effektor-Mechanismus zur Elimination der Erreger in Gang setzen (MORITZ et al., 2001; NOLI, 1999; PINELLI et al., 1999). An diesem Prozeß sind u. a. reaktive Sauerstoffintermediate und Stickstoffradikale (NO) beteiligt (BOGDAN, 1998). Beim Hund konnten PINELLI et al. schon 1995 zeigen, daß periphere mononukleäre Zellen von asymptomatischen, experimentell infizierten Hunden aufgrund von Antigen-induzierter Stimulation in der Lage sind IFN- γ und IL-2 zu produzieren. Zellen von erkrankten Tieren konnten dies nicht (PINELLI et al. 1995; KIMA et al. 1996). Erste Untersuchungen im Blut natürlich infizierter serologisch positiver Hunde zeigten im Vergleich mit gesunden Kontrolltieren verminderte absolute Werte für CD4+- und CD21+-Zellen. Für die Autoren ein erster Hinweis, daß die verringerte Anzahl CD4+-Zellen mit der Immunstörung von Leishmaniose-erkrankten Tieren in Verbindung steht (BOURDOISEAU et al., 1997). Der genaue Grund für den Verlust von CD4+-Zellen ist aber nach wie vor unklar (MORENO et al., 1999). Auch die Stimulierbarkeit peripherer mononukleärer Zellen durch Mitogene (Concanavalin A, Phytohämagglutinin, Pokeweed Mitogen) ist bei infizierten Tieren schon am Beginn der Infektion deutlich reduziert (DE LUNA et al., 1999). An *in vitro* mit Leishmanien infizierten kaninen Makrophagen ist zusätzlich eine verminderte Expression des ko-

stimulatorischen Moleküls B7 festzustellen. Dies läßt vermuten, daß auch Parasiten-spezifische T-Zellen eine genügende Anzahl dieses Moleküls zur Zell-Proliferation und Bildung von IFN- γ benötigen (PINELLI et al. 1999). Die Hyperglobulinämie resultiert aus einer hohen Anzahl spezifischer Antikörper, die jedoch keine Schutzfunktionen besitzen und durch Bildung von Immunkomplexen, die sich in den Basalmembranen ablagern, eher schädlich sind. Diese Hyperglobulinämie steht im Widerspruch zur reduzierten Zahl CD21⁺ und slg⁺ B-Zellen, die von BOURDOISEAU et al. 1997 beschrieben wurde. Die Synthese von Antikörpern findet jedoch in Lymphknoten, Peyer'schen Platten und im Knochenmark statt, so daß vermutet wird, daß die meisten B-Zellen dorthin auswandern (BOURDOISEAU et al., 1997). MORENO et al. fanden 1999 bei 11 infizierten Hunden im Gegensatz dazu eine erhöhte Anzahl von slg⁺ B-Zellen im peripheren Blut und begründen damit den Anstieg der Immunglobuline (MARTINEZ-MORENO et al. 1993; MORENO et al., 1999).

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Untersuchungsgut

Als Vergleichsgruppen und zur Etablierung der Methode wurden 4 Kontrollgruppen gebildet. Eine adulte Gruppe unterschiedlicher Rassen (n=20), eine Welpenkontrollgruppe unterschiedlicher Rassen (n=10), sowie eine Gruppe bestehend aus Blutspendehunden (Beagle) der Medizinischen und Gerichtlichen Veterinärklinik, Innere Krankheiten der Kleintiere (n=10), wurden untersucht. Vorversuche sowie erste Messungen mit dem Durchflußzytometer wurden ebenfalls mit einer Gruppe aus Blutspendehunden (Beagle) (n=10) durchgeführt. Das Patientenmaterial bestand aus insgesamt 96 Tieren, aus denen eine Gruppe mit Hyperadrenokortizismus- (n=29), eine mit Leishmaniose- (n=15), sowie eine Gruppe mit Parvovirose-Patienten (n=21) gebildet wurde. Die Tiere, die nicht eindeutig einer der drei Krankheitsgruppen zuzuordnen waren oder andere Erkrankungen zeigten (n=31), sind nicht mit in die statistische Auswertung einbezogen. Die verschiedenen Gruppen und ihre Verwendung sind in den Tabellen 2 und 3 dargestellt. Blut wurde mittels Venenpunktion an der *Vena cephalica antebrachii* oder der *Vena saphena* gewonnen und in einem Mikroprobengefäß (Fa. Sarstedt) mittels K₃EDTA antikoaguliert. Bis auf Ausnahmen (Kapitel 3.6) sind die einzelnen Proben innerhalb von 5 h untersucht worden.

Tab.2 Übersicht der 4 Kontrollgruppen

Kontrollgruppe	1	2	3	4
Rasse	Beagle	Beagle	Verschiedene	Verschiedene
Alter	Adult	Adult	Welpen	Adult
Größe	n=10	n=10	n=10	n=20
Verwendung	Blutpräparation Etablierung Methode	Etablierung Vergleich mit gemischt- rassigen Hunden Lagerungs- versuch	Vergleich mit Parvo-Gruppe	Vergleich mit Leishmaniose und Cushing- Gruppe

Tab.3 Übersicht der 4 Patientengruppen

Patientengruppe	1	2	3	4
Klinische Diagnose	Parvovirose	Morbus Cushing	Leishmaniose	Andere
Größe	n=21	n=29	n=15	n=31

3.1.1 Kontrollgruppen 1 und 2 (Beagle-Gruppen)

Als Kontrolltiere wurden 20 Blutspendehunde der Medizinischen und Gerichtlichen Veterinärklinik mit in die Untersuchung einbezogen. Sie sind unter gleichen Fütterungs- und Haltungs-Bedingungen gehalten worden. Blut von den ersten 10

Tieren (Kontrollgruppe 1) wurde für alle notwendigen Vorversuche verwendet und diente zur Etablierung der Methode. Weitere 10, in Tabelle 4, aufgeführten Beagle (Kontrollgruppe 2) sind im gleichen Verfahren wie alle anderen Patienten gemessen worden und dienten als Vergleichsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe 4 mit Hunden unterschiedlicher Rassen. Das Blut der Beagle B7-B10 wurde außerdem für einen Lagerungsversuch verwendet (Kapitel 3.6). Alle Hunde dieser Gruppe waren klinisch unauffällig und frei von erkennbaren Erkrankungen. Das Durchschnittsalter lag bei 5,7 Jahren, 9 der 10 Tiere waren männlichen Geschlechts.

Tab. 4 Zusammensetzung der Kontrollgruppe 2

Tier-Nr.	Alter (Jahre)	Ge- schlecht	Rasse	Tier-Nr.	Alter (Jahre)	Ge- schlecht	Rasse
B1	4	w	Beagle	B6	3	m	Beagle
B2	10	m	Beagle	B7	5	m	Beagle
B3	10	m	Beagle	B8	5	m	Beagle
B4	8	m	Beagle	B9	6	m	Beagle
B5	3	m	Beagle	B10	5	m	Beagle

3.1.2 Kontrollgruppe 3 (Welpengruppe)

Die Welpenkongrollgruppe bestand aus 10 Tieren, die in der Tabelle 5 aufgeführt sind. Alle Welpen stammten aus privatem Besitz und waren klinisch unauffällig. Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, waren zum Zeitpunkt der Untersuchung alle Welpen unter 6 Monaten alt. Alle Hunde waren reinrassig, wobei 8 weibliche und 2 männliche Tiere mit in die Auswertung einbezogen wurden.

Tab. 5 Zusammensetzung der Kontrollgruppe 3

Tier-Nr.	Alter (Monate)	Ge-schlecht	Rasse	Tier-Nr.	Alter (Monate)	Ge-schlecht	Rasse
W1	3	m	Bull-Mastiff	W6	5	w	DSH
W2	3	w	Bull-Mastiff	W7	4	w	DSH
W3	3	w	Bull-Mastiff	W8	2	m	DSH
W4	6	w	DSH	W9	2	w	Zwschn.
W5	6	w	DSH	W10	2	w	Zwschn.

DSH = Deutscher Schäferhund, Zwschn. = Zwergschnauzer

Tab. 6 Zusammensetzung der Kontrollgruppe 4

Tier-Nr.	Alter (Jahre)	Ge-schlecht	Rasse	Tier-Nr.	Alter (Jahre)	Ge-schlecht	Rasse
A1	9	m	Mix	A11	9	w	Gold. Retr.
A2	3	w	York. Terrier	A12	12	w	Mittelschn.
A3	3	w	Münsterl.	A13	12	m	Mix
A4	6	m	Mix	A14	1	m	West. Fuchs
A5	5	w	Mix	A15	1	m	BSH
A6	2	m	Rottweiler	A16	1	w	Fox-Terrier
A7	4	m	Mix	A17	6	w	Irish-Setter
A8	3	w	Mix	A18	2	w	Labrador
A9	3	m	Mix	A19	2	m	Rottweiler
A10	3	w	Mix	A20	4	w	Bull-Mastiff

York. Terrier= Yorkshire Terrier, Münsterl.= Münsterländer, Gold. Retr.= Golden Retriever, Mittelschn.= Mittelschnautzer, West. Fuchs= Westerwälder Fuchs, BSH= Berner Sennenhund

3.1.3 Kontrollgruppe 4 (Adulte Gruppe)

Die adulte Kontrollgruppe bestand aus 20 Hunden mit einem Durchschnittsalter von 4,55 Jahren, von denen 12 reinrassig und 8 Tiere Mischlinge waren (Tabelle 6). Alle Tiere stammten aus privatem Besitz und hatten unterschiedliche Haltungs- und Fütterungsbedingungen. Sie waren zum Zeitpunkt der Untersuchung klinisch unauffällig.

3.1.4 Patientengruppe 1 (Parvovirose-Gruppe)

In die Gruppe der Parvovirose-Patienten sind Tiere eingeordnet, die mit hochgradiger, hämorrhagischer Enteritis in unsere Klinik kamen (Tab. 7). Durch die klinische Symptomatik in Kombination mit dem jungen Alter und einer Leukopenie lag bei jedem einzelnen Tier ein starker Parvovirose-Verdacht vor. Sechs der 21 Hunde (P4 ,P7 ,P8 ,P12 ,P15 ,P20) starben noch während des Klinikaufenthaltes trotz intensiver therapeutischer Maßnahmen. Bei den 2 (P12, P15) anschließend pathologisch untersuchten Tieren konnte der Parvovirose-Verdacht bestätigt werden. Elektronenmikroskopischer Nachweis des Parvovirus (aus Sammelkotproben) gelang bei 4 Patienten (P2, P3 ,P19 ,P20) dieser Gruppe. Zusammengesetzt ist die Gruppe aus 9 männlichen und 12 weiblichen Hunden, von denen bis auf 2 alle reinrassig waren. Alle Tiere waren zum Zeitpunkt der Untersuchung jünger als 6 Monate.

3.1.5 Patientengruppe 2 (Morbus Cushing-Gruppe)

Das Patientenmaterial stammt zum größten Teil aus unserer Klinik. Zusätzliche Blutproben, von verschiedenen praktizierenden Tierärzten eingesandt, wurden mit untersucht und in die statistische Analyse einbezogen. Die Diagnose des Hyperadrenokortizismus erfolgte anhand des klinischen Bildes, in Kombination mit krankheitstypisch veränderten Blutparametern und mindestens einem positivem Funktionstest (Low-Dose-Suppressionstest oder ACTH-Stimulationstest). Alle Kortisolbestimmungen wurden durch das medizinische Labor BioControl, Ingelheim durchgeführt. Nur Tiere, mit eindeutig positiven Funktionstests sind dieser Gruppe zugeordnet. Das Durchschnittsalter der Gruppe betrug 9,76 Jahre, mit einem Anteil von 7 Mischlingen gegenüber 22 reinrassigen Tieren. In Tabelle 8 sind die 17 weiblichen und 12 männlichen Hunde dieser Gruppe aufgeführt.

Tab. 7 Zusammensetzung der Parvovirose-Gruppe

Tier-Nr.	Alter (Monate)	Ge-schlecht	Rasse	Tier-Nr.	Alter (Monate)	Ge-schlecht	Rasse
P1	4	w	ASH	P12	2	w	Kl. Münst.
P2	4	m	ASH	P13	2	m	Kl. Münst.
P3	4	w	ASH	P14	2	m	Kl. Münst.
P4	4	w	ASH	P15	2	w	Kl. Münst.
P5	6	w	Neufundl.	P16	5	m	Mix
P6	6	w	Neufundl.	P17	4	w	Mix
P7	6	w	Neufundl.	P18	2	m	Rottweiler
P8	6	w	Neufundl.	P19	4	w	DSH
P9	3	m	Labrador	P20	3	m	DSH
P10	3	m	Rottweiler	P21	3	m	DSH
P11	4	w	Boxer				

ASH= Amerikanischer Schäferhund, Neufundl.= Neufundländer, Kl. Münst.= Kleiner Münsterländer, DSH= Deutscher Schäferhund

Tab. 8 Zusammensetzung der Morbus-Cushing-Gruppe

Tier-Nr.	Alter (Jahre)	Ge-schlecht	Rasse	Tier-Nr.	Alter (Jahre)	Ge-schlecht	Rasse
C1	11	w	RHD	C8	5	m	WHT
C2	13	w	RHD	C9	11	m	LHD
C3	9	w	Mix	C10	14	m	RHD
C4	9	m	Mix	C11	6	w	Mix
C5	8	w	WHT	C12	10	w	Mix
C6	10	w	RHD	C13	5	m	Griffon
C7	9	w	WHT	C14	8	w	RHD

Tab. 8 (Fortsetzung)

Tier-Nr.	Alter (Jahre)	Ge-schlecht	Rasse	Tier-Nr.	Alter (Jahre)	Ge-schlecht	Rasse
C15	7	w	Fox Terrier	C23	15	w	Pudel
C16	12	m	Pudel	C24	14	w	Rh.Ridgeb.
C17	10	w	Mix	C25	14	m	RHD
C18	11	w	York.Terrier	C26	7	m	RHD
C19	8	w	RHD	C27	12	m	RHD
C20	11	m	Mix	C28	5	w	K.C. Spaniel
C21	9	m	Mix	C29	12	m	York. Terrier
C22	8	w	n. b.				

RHD= Rauhaardackel, WHT= West Highland Terrier, LHD= Langhaardackel, Rh.Ridgeb.= Rhodesian Ridgeback, K.C.-Spaniel= King Charles Spaniel, York.-Terrier= Yorkshire Terrier

3.1.6 Patientengruppe 3 (Leishmaniose-Gruppe)

Die Proben der Leishmaniose-Patienten stammten, bis auf eine Probe, aus unserer Klinik. Eine Probe wurde von einer privaten Praxis übergeben. Die Diagnose der Leishmaniose erfolgte durch das klinische Erscheinungsbild in Kombination mit einem direkten (Zytologie, PCR) oder indirekten (Antikörper-Titer) Erregernachweis. Nicht bei allen Hunden konnten die gleichen Untersuchungen durchgeführt werden, so daß unterschiedliche Tests zur Diagnose der Erkrankung dienten. Bei allen Tieren waren deutliche Hautveränderungen und veränderte Organparameter diagnostiziert worden. In der von BOURDOISEAU et al. (1997) vorgeschlagenen Aufteilung würden diese Hunde der Gruppe 2 (infizierte Tiere mit fortgeschrittenen Krankheitssymptomen) angehören. Ein Auslandsaufenthalt in einem für Leishmaniose endemischen Gebiet konnte bei allen untersuchten Hunden dieser Gruppe festgestellt werden. Patienten mit einem fraglichen Titer ohne direkten Erregernachweis sind nicht mit in diese Gruppe eingegliedert. Das Durchschnittsalter der Gruppe beträgt 3,8 Jahre, mit einem Anteil von 9 Mischlingen gegenüber 6 reinrassigen Tieren. In Tabelle 9 sind die 5 weiblichen und 10 männlichen Hunde dieser Gruppe aufgeführt.

Tab.9 Zusammensetzung der Leishmaniose-Gruppe

Tier-	Alter (Jahre)	Geschlecht	Rasse	Diagnose/Labor
L1	3	w	Mix	Titer +
L2	8	m	Mix	Zyto-KM +, KM-PCR+
L3	5	m	Riesenschnauzer	Titer +
L4	5	m	Mix	Titer +
L5	1	m	Mix	Titer +
L6	6	m	Mix	Titer +, KM-PCR+
L7	2	w	Dobermann	Titer +
L8	3	m	Langhaardackel	Titer +
L9	4	w	Mix	Titer +
L10	7	m	Mix	Titer+, Zyto-KM+
L11	2	m	Mix	KM-PCR+
L12	1	w	Mix	Zyto KM +
L13	1	m	Boxer	Zyto KM +, KM-PCR+
L14	4	w	Bull-Terrier	Titer+, KM-PCR+
L15	4	m	Deutsche Dogge	Titer+, KM-PCR+

Titer+= Titer höher als 1/80; Zyto-KM+= Erreger im Knochenmark histologisch nachgewiesen; KM-PCR+= Erreger mittels PCR im Knochenmark nachgewiesen

3.1.7 Patientengruppe 4 (Gruppe mit anderen Erkrankungen)

Die Tiere, die nicht eindeutig einer der anderen Gruppen zugeordnet werden konnten oder andere Erkrankungen hatten sind in der Patientengruppe 4 zusammen gefasst. Die Tabelle 10 zeigt eine Übersicht der Hunde inklusive einer Verdachtsdiagnose bzw. Diagnose.

Tab.10 Zusammensetzung der Patientengruppe 4

Tier-	Alter (Jahre)	Geschlecht	Rasse	Verdachtsdiagnose/Diagnose
AE 1	4	w	Tibet-Terrier	chron. Enteritis
AE 2	8	m	DSH	chron. Enteritis
AE 3	2	m	Mix	chron. Enteritis
AE 4	3	m	Dobermann	chron. Enteritis
AE 5	2	m	Mix	chron. Enteritis
AE 6	6	w	Irish Setter	häm. Enteritis
AE 7	2	w	Mix	häm. Enteritis
AE 8	3	w	Irish-Setter	Leishm.-Verdacht
AE 9	2	w	Mix	Leishm.-Verdacht
AE 10	5	m	Mix	Leishm.-Verdacht
AE 11	6	w	RHD	Leishm.-Verdacht
AE 12	1	w	Mix	Staupe-Verdacht
AE 13	1	w	Mix	Staupe-Verdacht
AE 14	1	w	Mix	Staupe-Verdacht
AE 15	1	m	Dobermann	Staupe-Verdacht
AE 16	1	m	DSH	Staupevirusinfektion
AE 17	1	w	Mix	Staupevirusinfektion
AE 18	5	w	Mix	Demodikose
AE 19	8	w	DSH	Pyodermie
AE 20	5	m	DSH	Pyodermie
AE 21	1	m	Boxer	Pyodermie
AE 22	4	w	DSH	malignes Lymphom
AE 23	5	w	Mix	malignes Lymphom
AE 24	5	m	Mix	malignes Lymphom

Tab.10 (Fortsetzung)

Tier-	Alter (Jahre)	Geschlecht	Rasse	Verdachtsdiagnose/Diagnose
AE 25	4	w	Bobtail	malignes Lymphom
AE 26	7	w	Welsh-Terrier	Diabetes mellitus
AE 27	12	m	Bobtail	Plasmozytom
AE 28	1	w	Briard	Osteolyse
AE 29	2	m	Mix	chron. Bronchitis
AE 30	9	w	RHD	chron. Pankreatitis
AE 31	1	w	Mix	Enteritis/Bronchitis

DSH= Deutscher Schäferhund, RHD= Rauhaardackel

3.2 Bestimmung der Lymphozytenanzahl

Die automatische Zelldifferenzierung aus Vollblut erfolgte am Hämatologiesystem H*1 (Fa. Bayer) sowie am Hämatologiesystem ADVIA 120 (Fa. Bayer), die an der Medizinischen und Gerichtlichen Veterinärklinik für innere Krankheiten der Kleintiere der Justus-Liebig Universität, Gießen schon seit längerem in der Routinediagnostik eingesetzt werden. Beide Geräte ermöglichen neben der Zählung der Blutzellen auch eine genaue Differenzierung der Leukozyten (FICKENSCHER, 2001; MORITZ 2000). Die Anzahl der Lymphozyten liefert die Basis zur Errechnung von absoluten Werten bei den Subpopulationen. Dabei errechnet sich der absolute Wert aus der prozentualen Verteilung und den am ADVIA 120 und H1 gemessenen Zahlen.

3.3 Blutpräparation

Die Erythrozyten-Lyse wurde durch Inkubation (10 Sekunden) des Vollblutes mit Aqua bidest. durchgeführt. Danach wurde, um die Genauigkeit zu erhöhen jede Blutprobe gedrittelt und parallel gesondert gemessen.

Als primäre Antikörper dienten die in Tabelle 11 aufgeführten und in Kapitel 2.1.3 beschriebenen mAK. Die 4 verwendeten Antikörper sind gegen Epitope von caCD5, caCD4, caCD8 und caCD21(like) gerichtet und wurden freundlicherweise von Prof. Dr. W. Baumgärtner (Institut für Veterinär-Pathologie, Justus-Liebig-Universität, Gießen) zur Verfügung gestellt.

Tab. 11 Verwendete monoklonale Antikörper gegen Oberflächenantigene kaniner Leukozyten

Spezifität	Klon	Isotyp	Spezies	Gebrauchs-Verdünnung
caCD5	DOG 17-4-8	IgG2a	Ratte	1:100
caCD4	YKIX302.9.3.7	IgG2a	Ratte	1:100
caCD8	DOG 10-1-1	IgG1	Maus	1:1000
caCD21(like)	CA2.1D6	IgG1	Maus	1:250

Die Bindung der primären Antikörper an die entsprechenden Zellen wurde mit Fluorochrom-markierten Sekundärantikörpern nachgewiesen. Verwendet wurden hier entweder ein mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) konjugiertes gegen Ratten-Immunoglobulin IgG gerichtetes F(ab)₂-Fragment oder ein gegen Maus-Immunoglobulin der Klasse IgG gerichteter und mit R-Phycoerythrin (PE)-gekoppelter Antikörper. Beide Sekundärantikörper wurden in der Ziege hergestellt (Tabelle 12).

Tab.12 Verwendete Sekundärantikörper

Spezifität	Firma Produkt-Nr	Isotyp	Spezies	Verdünnung
Anti-Ratte	Dianova 112-096-062	F(ab) ₂ -Fragment	Ziege	1:100
Anti-Maus	Sigma P-9287	IgG	Ziege	1:50

Die genaue Blutpräparation erfolgte nach folgendem Schema:

1. Vermischung von 200 µl Vollblut mit 3600 µl Aqua bidest. in einem Plastikröhrchen.
2. Nach 10 Sekunden Zugabe von 400 µl 10-fach konzentriertem PBS und Durchmischung.
3. Zentrifugation der Probenröhrchen (150 x g, 7 min, 4 °C) und Dekantierung des Überstandes.
4. Resuspension des Zellpellets in 250 µl PBS.
5. Einsetzen der Zellen (jeweils 50 µl) in eine Mikrotiterplatte (V-Form, Fa. Greiner).
6. Zentrifugation der Platte (150 x g, 7 min, 4 °C) und Ausschlagen des Überstandes (Zentrifugationsschritt).
7. Resuspendierung der Zellpellets in je 25 µl antikörperhaltigen Zellkulturüberstandes (Primärantikörper siehe oben).
8. Inkubation (20 min), anschließend Zentrifugationsschritt.
9. Resuspendierung der Zellpellets in 150 µl PBS, anschließend Zentrifugationsschritt.

10. Resuspendierung der Zellpellets mit je 25 µl Gebrauchslösung der entsprechenden Fluorochrom-markierten Sekundärantikörper.
11. Inkubation (20 min), anschließend Zentrifugationsschritt.
12. Zweimalige Resuspendierung der Zellpellets in 150 µl PBS mit jeweils anschließendem Zentrifugationsschritt.
13. Aufnahme der Zellpellets in 50 µl PBS und Überführung in Teströhrchen mit jeweils 100 µl PBS.

Die gesamte Präparation wurde auf Eis durchgeführt.

3.4 Durchflußzytometrie

Die durchflußzytometrische Analyse wurde an einem EPICS® ELITE® Analyzer (Fa Coulter), ausgerüstet mit einem 488 nm Argonlaser und einer Standardfilterkombination (488 nm für Fluoreszenz 1 (FL.1), 525 nm für FL.2, 575 nm für FL.3 und 630 nm für FL.4), durchgeführt. Nach Blutpräparation sind zur morphologischen Differenzierung und Immunophänotypisierung pro Einzelprobe 5000 Ereignisse (Zellen) gemessen worden. In einem ersten Analyseschritt wurden dabei vom Durchflußzytometer anhand der morphologischen Parameter Größe und Granularität Punktwolken dargestellt, die eine eindeutige Differenzierung in Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten und Zellreste (Debris) erlaubt (siehe Abb.1). Die Einstellung der Geräteparameter erfolgte in Vorversuchen, wurde als Standardprotokoll gespeichert und für alle weiteren Messungen verwendet.

Die Fluoreszenzintensität, die ebenfalls für jede Zelle einzeln erfaßt und gespeichert wird, ist dabei direkt proportional zur Menge des gebundenen Farbstoffes und damit ein Maß für die Dichte der Antigenexpression auf der Zelle. Durch Setzen von Schwellen wurden positive von negativen Zellen getrennt, wobei die Ermittlung des Schwellenwertes (<2%) anhand jeweils einer Negativkontrolle (Zellen nur mit Sekundärantikörpern inkubiert) erfolgte.

Die Analyse und Aufarbeitung der gemessenen Daten am Durchflußzytometer erfolgte mit einem gerätespezifischen Computerprogramm (Elite, Version 4.01).

3.5 Vorversuche und Geräteevaluierung

Anhand der Blutproben von 10 Hunden (Kontrollgruppe 1) wurden Vorversuche durchgeführt mit dem Ziel, die Genauigkeit der Messung zu überprüfen. Dabei wurden anhand einer Streuungszerlegung die Standardabweichungen zwischen den einzelnen Hunden und durch Aliquotierung der einzelnen Blutproben in drei Teile, auch die Standardabweichung für die Genauigkeit der Labortechnik gegenüber dem Mittelwert aller Tiere bestimmt. Durch Doppelmessung der Leukozytensuspensionen am Durchflußzytometer wurde abschließend auch die Standardabweichung für das Gerät ermittelt.

3.6 Lagerungsversuch

Da verschiedene Blutproben erst innerhalb von 72 h bearbeitet werden konnten, wurde zur Überprüfung der Stabilität der Analyseergebnisse ein Lagerungsversuch durchgeführt. Dabei sind die Blutproben der Beagle B7-B10 (Kap. 3.1.1) bei Zimmertemperatur gelagert und in täglichen Abständen ein Aliquot untersucht worden. Die erhaltenen Ergebnisse wurden auf signifikante Unterschiede durch die Alterung untersucht.

3.7 Statistische Auswertung

Die statistische Datenbewertung erfolgte durch die Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig Universität, Gießen (Leiter Dr. K. Failing). Alle statistischen Auswertungen wurden unter Anwendung des Statistikprogramms BMPD/Dynamic Release 7.0 durchgeführt. Die oben erwähnte Streuungszerlegung ist durch das Unterprogramm BMDP8V berechnet worden. In einer dreifaktoriellen hierarchischen Varianzanalyse wurden dabei die Standardabweichungen für die unterschiedlichen Hunde, die gedrittelten Blutproben und für die Doppelmessung am Durchflußzytometer gegenüber dem Mittelwert $\bar{x}$ errechnet.

Bei den Gruppenvergleichen zwischen den gesunden Welpen und den an Parvovirose erkrankten Tieren wurde mit einem t-Test für unabhängige Stichproben (BMDP3D) die Signifikanz für den Gruppeneinfluß, sowohl für die prozentuale Verteilung, wie auch für die absoluten Werte bestimmt. Dabei wurden die drei

erhaltenen Werte für jede Probe vorher zu einem Mittelwert zusammengefaßt. Um einen Alterseinfluss bei den Adulten mit zu berücksichtigen, wurde für die Vergleiche der adulten Tiere zuerst in einer einfaktoriellen Kovarianzanalyse das Alter mit einbezogen. Mit dem Programm BMDP1V wurden Altersabhängigkeit und Gruppenunterschiede untersucht. Da der Altereinfluß bei keiner Untersuchung eine signifikante Veränderungen ergab, wurden auch für die anderen Gruppen, zur besseren Vergleichbarkeit, die Signifikanzen mit einem t-Test für unabhängige Stichproben (BMDP3D) bestimmt. Für die prozentualen Werte CD5, CD4 und CD8 sind jeweils Mittelwerte mit Standardabweichung, für den prozentualen Wert CD21, alle absoluten Werte und den CD4/CD8- Quotienten der geometrische Mittelwert mit Standardfehler berechnet und angegeben. Für die Bezeichnung von Signifikanzen werden folgende Bezeichnungen verwendet:

- $p \leq 0,001$ hoch signifikant
- $p \leq 0,01$ signifikant
- $p \leq 0,05$ schwach signifikant
- $p > 0,05$ nicht signifikant

4 ERGEBNISSE

4.1 Differenzierung der Leukozyten

Nach Differenzierung in Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten und Zellreste (Debris) mit Hilfe der Parameter Größe (Forward Scatter) und „Granularität“ (Sideward Scatter)(Abb.1) wurden in einem zweiten Analyseschritt der Anteil FITC-positiver bzw. PE-positiver Zellen bestimmt. Die markierte Gruppe der Lymphozyten ist dabei in ein Zweiparameter-Histogramm übertragen und hinsichtlich ihrer Fluoreszenzintensität untersucht worden. Durch Kontrolluntersuchungen ohne Primärantikörper wurde dabei die Größe des Feldes für Zellen ohne Fluoreszenz festgelegt (Abb. 3/4).

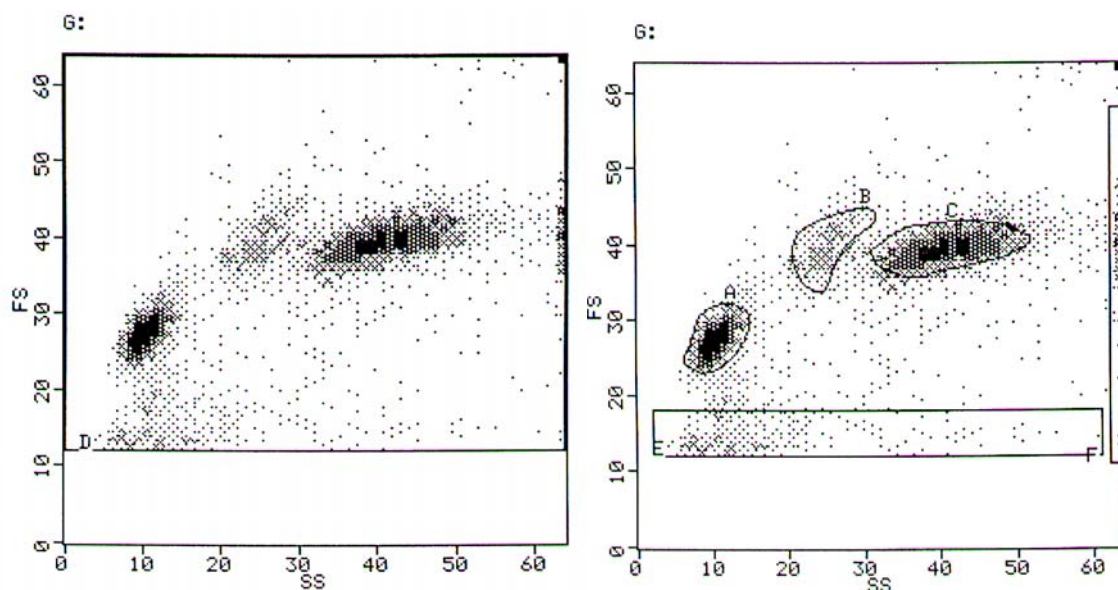


Abb. 1 Punkthistogramm des Hundes des Patienten L 12 ohne und mit Markierung der zu differenzierenden Populationen (A= Lymphozyten, B= Monozyten, C= Granulozyten, D= Schwellenwert/Meßbereich, E+F= Debris, FS= Forward Scatter= „Zellgröße“, SS= Sideward Scatter= „zelluläre Granularität“)

4.1.1 Nachweis von CD4, CD8 und CD21

CD4+ Lymphozyten waren sehr deutlich von den negativen Zellen zu trennen. Der ermittelte Mittelwert für CD4+ Lymphozyten bei gesunden erwachsenen Hunden (Kontrollgruppe 3) ist 47,75% der Gesamtlymphozytenzahl. Ein Beispiel ist in der Abb. 3 (b) zu sehen.

Neben den CD4+ Lymphozyten waren auch viele Zellen der Granulozyten-Population CD4+. Der Mittelwert der positiven Zellen aus dieser Gruppe bei gesunden erwachsenden Hunden ist 84,90%

In der Gruppe der Parvovirose-Patienten gab es Tiere (16 von 21), die einhergehend mit einer Leukopenie auch einen verminderten Anteil CD4+-Zellen bei den Granulozyten hatten. Bei wiederholter Blutentnahme, stieg der Anteil CD4+-Granulozyten nach einigen Tagen jedoch wieder an. Der Mittelwert von CD4+-Granulozyten bei unseren 21 Parvovirose-Patienten ist 36,55% am Tage der Erstuntersuchung in der Klinik. Bei den Patienten (11 von 21), die nach 6 Tagen noch zu einer Nachuntersuchung zur Verfügung standen, stieg der Mittelwert auf 81,31% an.

Die mit Phycoerythrin (PE) markierten CD8+ und CD21+ -Zellen waren nur innerhalb der Lymphozytenpopulation nachzuweisen.. Der von uns bestimmte Mittelwert für CD8+-Lymphozyten bei gesunden erwachsenen Tieren (Kontrollgruppe 3) ist 26,28%, der Mittelwert für CD21+ Lymphozyten ist 12,94% der Gesamtlymphozytenzahl.

4.1.2 Nachweis von CD 5

Bezüglich CD5+-Zellen zeigte sich bei vielen Hunden eine eindeutige Teilung in zwei Fraktionen (Abb. 4 (a)). Die Fraktionsgröße konnte dabei sehr unterschiedlich sein (Abb. 4 (c)). Bei den meisten Tieren war die Trennung jedoch nicht deutlich ausgeprägt (Abb. 4 (d)), so daß auf eine quantitative Auswertung der einzelnen Fraktionen verzichtet werden mußte. Der Mittelwert für CD5+- Lymphozyten bei gesunden erwachsenen Tieren ist 81,01% (n=19). Eine beträchtliche Anzahl der von uns gemessenen Hunde zeigte keine CD5+-Zellen im peripheren Blut (Wert<3%)

(Abb. 4 (b)). Auch bei Wiederholungsmessungen bei einigen dieser Tiere konnten über einen längeren Zeitraum keine CD5+-Zellen gefunden werden. Die Verteilung dieser „CD5 negativen-Hunde“ im Hinblick auf deren Erkrankung ist in Abbildung 2 dargestellt.

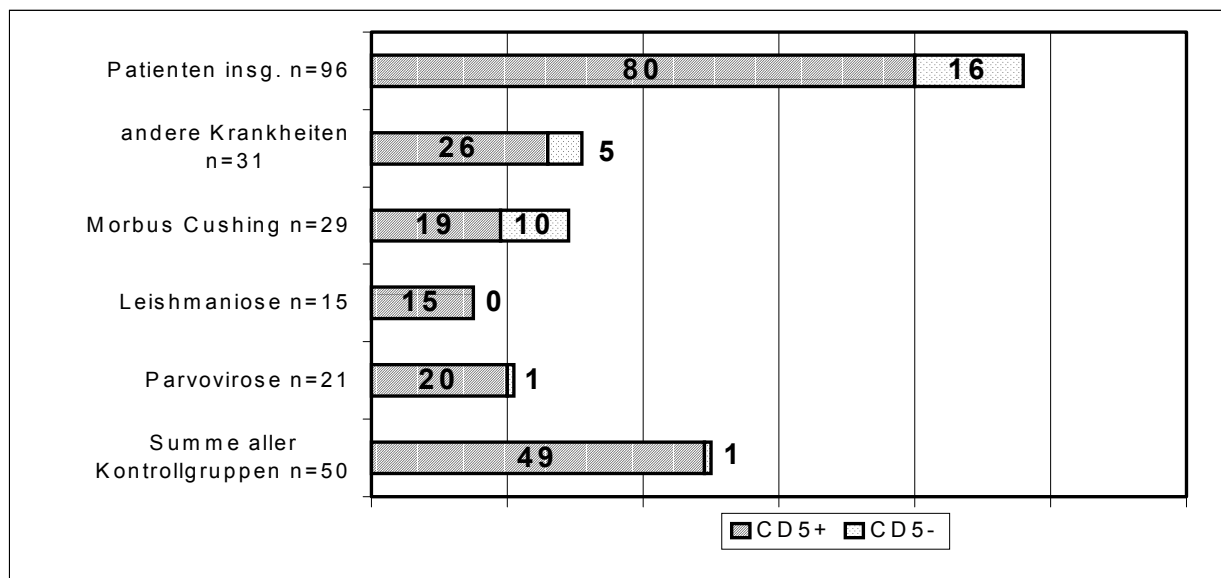


Abb. 2 Verteilung der „CD5 negativen-Hunde“

Einen direkten Bezug zwischen „CD5 negativen-Hunden“ und einer speziellen Erkrankung oder einem klinischen Erscheinungsbild konnte nicht festgestellt werden. Auch bei einem klinisch völlig gesunden Hund (A7) wurden keine CD5+ -Zellen nachgewiesen. Auffällig ist die hohe Anzahl der „CD5 negativen-Hunde“ in der Morbus Cushing-Gruppe (10 von 29 Hunden). Die 5 Tiere aus der Gruppe der „andere Krankheiten“ sind solche, die aufgrund unterschiedlicher Symptomatik behandelt wurden. Bei allen handelt es sich um chronisch kranke Patienten. Zwei der 5 Tiere zeigten eine rezidivierende Diarrhoe mit Fieber unklarer Genese. Drei Hunde hatten zweifelhafte Leishmaniose-Titer. Bei weiteren Untersuchungen konnte eine Leishmaniose jedoch nicht bestätigt werden. Hinzu kam bei einem der drei Tiere eine chronische Pankreatitis.

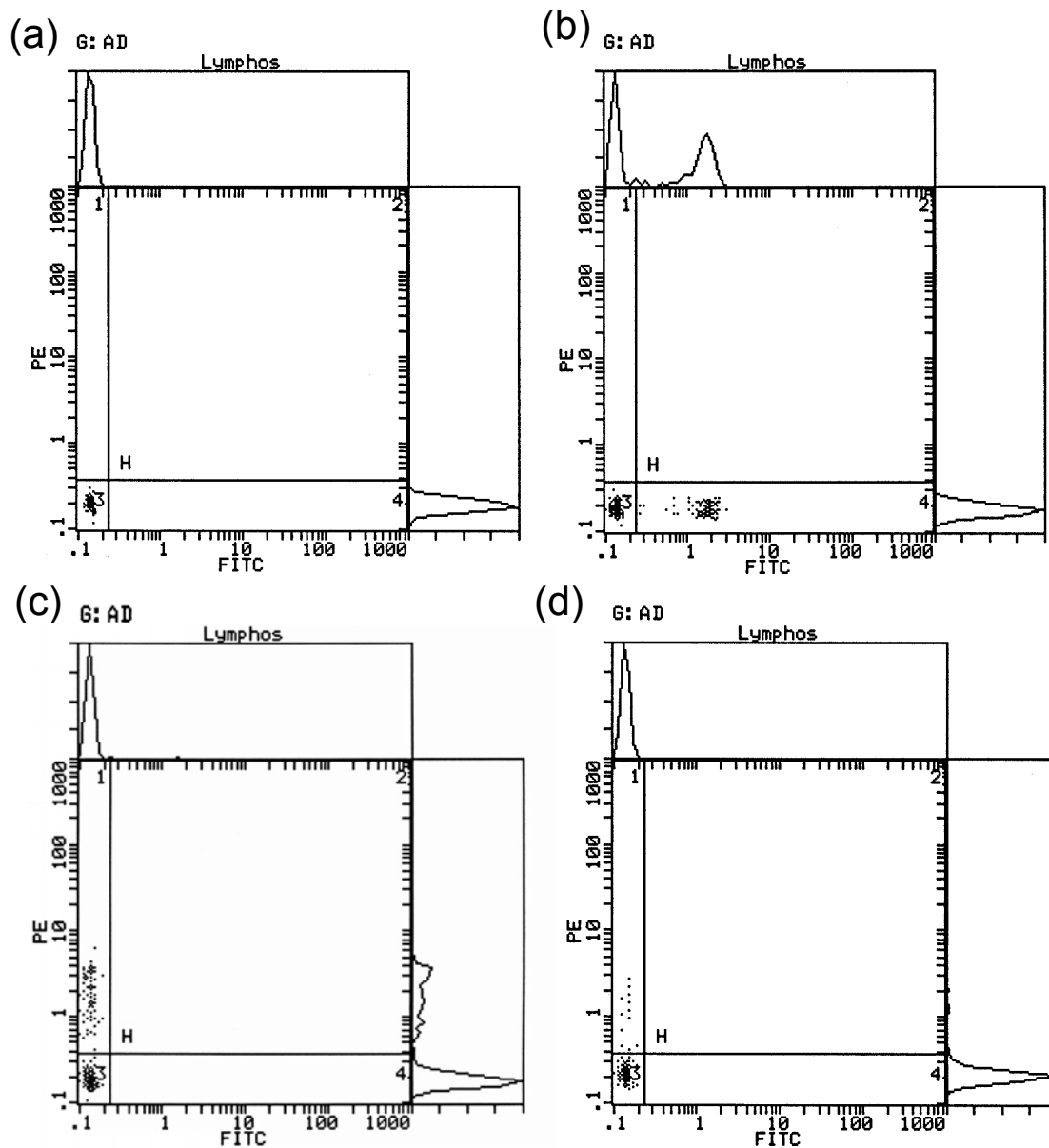


Abb. 3 Durchflußzytometrische Quantifizierung von CD4+, CD8+, CD21+-Lymphozyten (G:AD= Gate A aus D= Lymphozyten) und einer negativen Kontrolle; (a) Leishmaniose-Patient L14, Negativ-Kontrolle, (b) Leishmaniose-Patient L14, 51,6% CD4+-Zellen durch FITC markiert (Feld 4, logarithmisch dargestellt); (c) Leishmaniose-Patient L14, 33,5% CD8+-Zellen durch PE markiert (Feld 1, logarithmisch dargestellt); (d) Cushing-Patient C 6, 6,0 % CD21+-Zellen durch PE markiert (Feld 1, logarithmisch dargestellt)

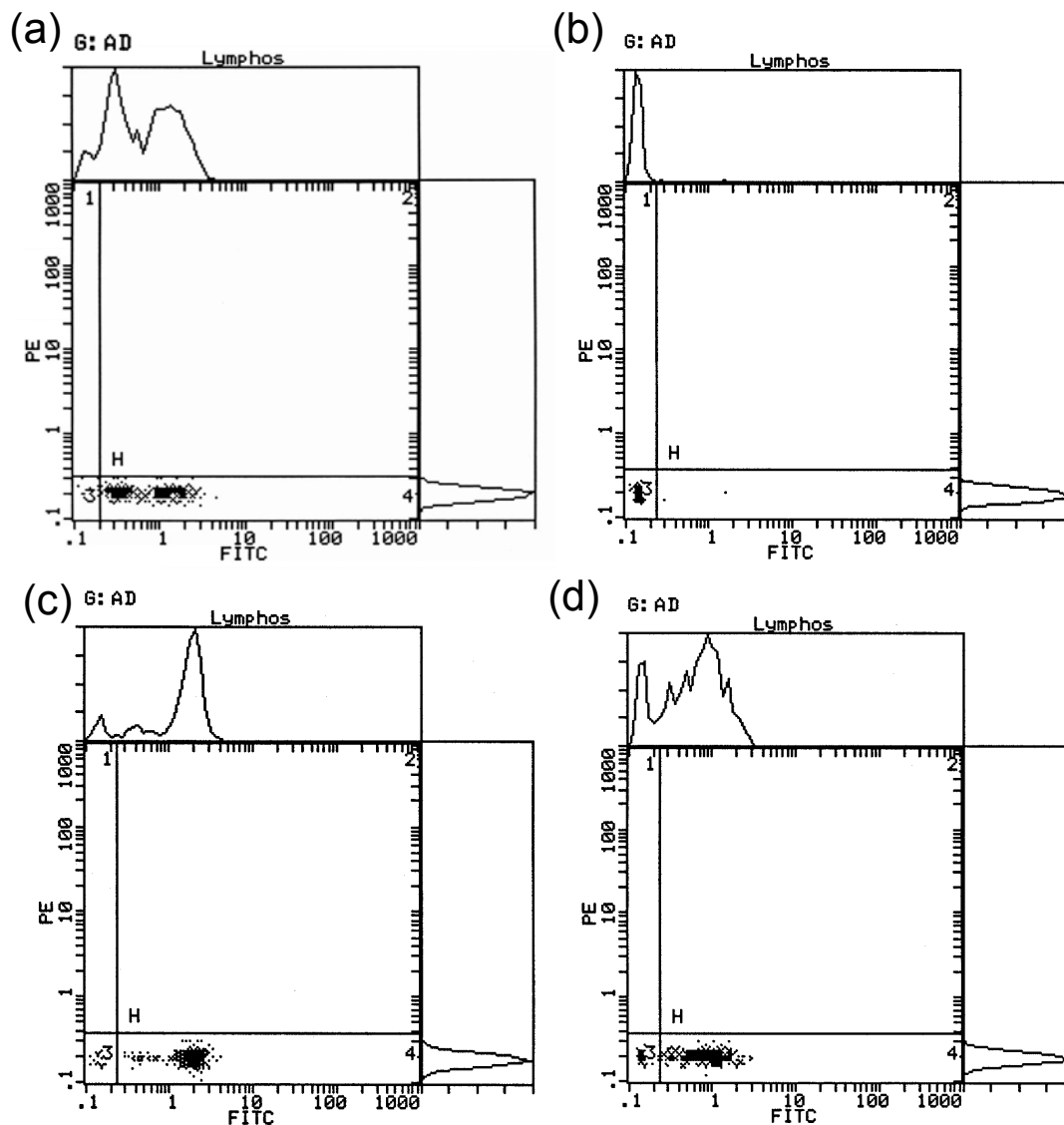


Abb. 4 Beispiele für die durchflußzytometrische Quantifizierung der FITC-markierten (Feld Nr.4, logarithmisch dargestellt) CD5+-Lymphozyten (G:AD= Gate A aus D= Lymphozyten). (a) Cushing-Patient C 6, deutliche Trennung der CD5+-Gruppe (91,4%) in eine stark markierte und eine etwas schwächer markierte Fraktion gleicher Größe; (b) Cushing-Patient C24, CD5+-Gruppe unter 3% („CD5-negativ“), (c) Leishmaniose-Patient L14, eine große stark- und eine kleine schwach-markierte Fraktion CD5+-Zellen (89,5%); (d) Cushing-Patient C22, keine Differenzierung zwischen einer stark markierten und einer etwas schwächer markierten Fraktion der CD5+-Gruppe (82,1%) möglich

4.2 Kontrollgruppe 1

Am Beginn der Untersuchung wurden die Ergebnisse aus einer Gruppe von 10 Beaglen hinsichtlich ihrer Reproduzierbarkeit in einer dreifaktoriellen hierarchischen Varianzanalyse überprüft. Die Durchschnittswerte aller Messungen und die Standardabweichungen sind in Tabelle 2 dargestellt. Die Überprüfung der labortechnischen Abweichungen durch dreifach parallel bearbeitete Blutproben ergab die Standardabweichungen S_{Pr} . Um Abweichungen des Gerätes zu erkennen, wurden Doppelmessungen durchgeführt und die Standardabweichung S_{Wdh} bestimmt. Die Abweichungen durch die verschiedenen Hunde sind durch den Wert S_{Hu} dargestellt.

Tab. 13 Mittelwerte der Kontrollgruppe 1 und ihre Standardabweichungen

	CD5	CD4	CD8	CD21
Positive Lymphozyten in %	81,41	42,39	31,92	6,96
S_{Hu}	4,35	6,74	6,88	1,20
S_{Pr}	4,22	2,37	1,86	0,87
S_{Wdh}	1,76	2,45	1,99	0,99

S_{Hu} =Standardabweichung zwischen verschiedenen Hunden; S_{Pr} = Standardabweichung zwischen parallel bearbeiteten Proben; S_{Wdh} = Standardabweichung der Doppelmessung am Durchflußzytometer

4.3 Lagerungsversuch

Da auch Blutproben verwendet worden sind, die postalisch von praktizierenden Tierärzten eingesandt wurden, mußte die Stabilität der Blutproben hinsichtlich der Ergebnisse überprüft werden. 4 verschiedenen Proben (B7-B10) wurden bei Zimmertemperatur gelagert und nach 0, 24, 48 und 72 Stunden auf ihre Lymphozytenzahl, sowie die prozentuale Verteilung der

Lymphozytensubpopulationen untersucht. Die Ergebnisse der Durchschnittswerte der 4 Beagle sind in Tabelle 14 dargestellt.

Nur der prozentuale Anteil CD21+-Lymphozyten stieg im gemessenen Zeitraum schwach signifikant an ($p=0,03$).

Tab. 14 Mittelwerte des Anteils positiver Lymphozyten mit Standardabweichungen nach Lagerung über 0, 24, 48, 72 Stunden der 4 untersuchten Hunde (Angabe in Prozent)

	0 h	24 h	48 h	72 h
CD5	82,18 $\pm$ 5,30	81,27 $\pm$ 3,87	81,24 $\pm$ 5,14	83,28 $\pm$ 4,02
CD4	36,66 $\pm$ 5,42	38,01 $\pm$ 4,10	41,52 $\pm$ 4,35	42,73 $\pm$ 6,97
CD8	35,84 $\pm$ 5,75	38,90 $\pm$ 6,11	37,54 $\pm$ 3,86	39,86 $\pm$ 2,83
CD21 *	13,36 $\pm$ 1,83	15,53 $\pm$ 1,43	16,47 $\pm$ 1,44	16,00 $\pm$ 2,07

* $p \leq 0,05$ für den Vergleich der Stunde 0 mit den Stunden 24, 48, 72

Tab. 15 Mittelwerte des Anteils positiver Lymphozyten mit Standardabweichungen nach Lagerung über 0, 24, 48, 72 Stunden der 4 untersuchten Hunde (Angabe der absoluten Zellzahl $\times 10^9/l$)

	0 h	24 h	48 h	72 h
CD5	1,39 $\pm$ 0,32	1,35 $\pm$ 0,22	1,33 $\pm$ 0,23	1,32 $\pm$ 0,22
CD4	0,63 $\pm$ 0,19	0,63 $\pm$ 0,11	0,68 $\pm$ 0,14	0,67 $\pm$ 0,15
CD8	0,60 $\pm$ 0,13	0,64 $\pm$ 0,11	0,61 $\pm$ 0,08	0,63 $\pm$ 0,11
CD21	0,22 $\pm$ 0,05	0,26 $\pm$ 0,06	0,27 $\pm$ 0,06	0,25 $\pm$ 0,06

4.4 Vergleich der Kontrollgruppen 2, 3, 4

Um Laboruntersuchungen an kranken Tieren durchzuführen war es aufgrund fehlender Normwerte notwendig, verschiedene gesunde Kontrollgruppen zu bilden. Bei der caninen Parvovirose handelt es sich um eine Erkrankung, die meist bei jüngeren Tieren zu schwerer klinischer Symptomatik führt. Es wurden nur Tiere unter 6 Monaten untersucht. Auf Grund dieser Tatsache wurde zusätzlich eine Welpenkontrollgruppe untersucht. Die Ergebnisse dieser Kontrollgruppe 3, sowie die Ergebnisse der Kontrollgruppen 2 und 4 sind in den Tabellen 16 und 17 aufgeführt. Es zeigen sich deutliche Unterschiede nicht nur zwischen adulten und jungen Tieren, sondern auch differierende Werte zwischen der reinrassigen Kontrollgruppe 2 (Beagle) und der gemischten Kontrollgruppe 4.

Tab. 16 Vergleich der Mittelwerte der relativen Verteilung von Lymphozyten im peripheren Blut bei 3 Kontrollgruppen (Angabe in Prozent)

Kontrollgruppe	CD5+	CD4+	CD8+	CD21+
2 (Beagle)	82,76	38,20	37,16	7,93
3 (Welpen)	66,93	40,36	26,76	27,98
4 (Adulte)	81,01	47,75	26,28	14,94

Tab. 17 Vergleich der Mittelwerte der absoluten Zellzahl von Lymphozyten im peripheren Blut bei 3 Kontrollgruppen (Angabe der absoluten Zellzahl $\times 10^9/l$)

Kontrollgruppe	CD5+	CD4+	CD8+	CD21+
2 (Beagle)	1,58	0,72	0,70	0,15
3 (Welpen)	2,64	1,59	1,05	1,12
4 (Adulte)	1,89	1,13	0,58	0,31

Beim statistischen Vergleich der beiden adulten Kontrollgruppen zeigen sich einige Unterschiede. So zeigt sich der CD4/CD8 Quotient der Beagle- gegenüber der Adultgruppe hoch signifikant niedriger ($p < 0,001$). Dies ergibt sich aus einem signifikant niedrigeren Anteil CD4+-Zellen ($p = 0,003$) und einem signifikant höheren Anteil CD8+-Zellen ($p = 0,003$). Auch der Anteil CD21+-Zellen ist schwach signifikant niedriger ($p = 0,018$). Bei den absoluten Zellzahlen ist die Anzahl CD4+-Zellen und CD21+-Zellen der Beagle gegenüber der Adultgruppe signifikant verändert ($p = 0,004$ und $p = 0,006$). In der Tabelle 18 sind die arithmetischen bzw. geometrischen Mittelwerte inklusive Standardabweichungen bzw. Streufaktoren der beiden Gruppen aufgeführt.

4.5 Vergleich der Kontrollgruppen mit den Patientengruppen

4.5.1 Kontrollgruppe 3 (Welpengruppe) vs. Patientengruppe 1 (Parvovirose-Gruppe)

Da bei einem Tier der Parvovirose-Gruppe keine CD5+-Zellen nachgewiesen werden konnten wurde es in der statistischen Berechnung für die CD5+-Gruppe nicht mit einbezogen, um den Mittelwert nicht zu verfälschen. Auffallend sind die großen Standardabweichungen sowohl der prozentualen, wie auch der absoluten Werte innerhalb der Parvovirose-Gruppe. Im Vergleich zwischen den gesunden Welpen und den 21 an Parvovirose erkrankten Welpen zeigen sich bei allen kranken Tieren hoch signifikant erniedrigte absolute Werte der von uns untersuchten 4 Subpopulationen (CD5abs. $p = 0,0003$; CD4abs. $p = 0,0001$; CD8abs. $p < 0,0001$; CD21abs. $p = 0,0004$). Bei der prozentualen Verteilung ist bei CD8+-Zellen ein hoch signifikanter Abfall festzustellen ($p = 0,0001$). Bei den anderen Antigenen konnten keine Unterschiede zwischen der Parvovirose-Gruppe und der gesunden Kontrollgruppe 3 festgestellt werden. Der CD4/CD8- Quotient erhöht sich schwach signifikant ($p = 0,02$) von 1,51 auf 2,24 bei den erkrankten Hunden (Tab. 19).

Tab. 18 Vergleich zwischen Kontrollgruppe 4 und Kontrollgruppe 2 (angegeben jeweils der arithmetische Mittelwert mit Standardabweichung; bei CD21, den absoluten Werten und dem CD4/CD8 -Quotient der geometrischer Mittelwert mit Streufaktor)

Antigen	relative Verteilung in % (arithmetischer Mittelwert mit Standardabweichung)	
	Kontrollgruppe 4 (n=20)	Kontrollgruppe 2 (n=10)
CD5	81,01±10,73 (n=19)	82,76 ±5,32
CD4	47,75 ±7,81	38,20 ±6,67**
CD8	26,28 ±9,83	37,16 ±5,80**
CD21	14,94 ±1,68 ¹	7,93 ±1,61 ^{1*}
CD4/CD8	1,95 ±1,64 ¹	1,03 ±1,36 ^{1***}

Antigen	absolute Zellzahl x10 ⁹ /l (geometrischer Mittelwert mit Streufaktor)	
	Kontrollgruppe 4 (n=20)	Kontrollgruppe 2 (n=10)
CD5	1,89 ±1,47 (n=19)	1,58 ±1,33
CD4	1,13 ±1,45	0,72 ±1,50**
CD8	0,58 ±1,95	0,70 ±1,39
CD21	0,31 ±2,03	0,15 ±1,44**

¹ geometrischer Mittelwert mit Streufaktor * $p \leq 0,05$ im Vergleich mit den Kontrollgruppe 3 ** $p \leq 0,01$ im Vergleich mit Kontrollgruppe 3 *** $p \leq 0,001$ im Vergleich mit Kontrollgruppe 3

Tab. 19 Vergleich zwischen Kontrollgruppe 3 (Welpengruppe) und Patientengruppe 1 (Parvovirose-Gruppe) (angegeben jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung, bei CD21, den absoluten Werten und dem CD4/CD8 -Quotient der geometrischer Mittelwert mit Streufaktor)

Antigen	relative Verteilung in % (arithmetischer Mittelwert mit Standardabweichung)	
	Kontrollgruppe 3 (n=10)	Parvovirose-Gruppe (n=21)
CD5	66,93 $\pm$ 9,75	57,45 $\pm$ 22,39 (n=20)
CD4	40,36 $\pm$ 7,52	40,56 $\pm$ 17,69
CD8	26,76 $\pm$ 5,20	17,10 $\pm$ 5,67***
CD21	27,98 $\pm$ 1,33 ¹	20,12 $\pm$ 2,77 ¹
CD4/CD8	1,51 $\pm$ 1,35 ¹	2,24 $\pm$ 1,77 ^{1*}

Antigen	absolute Zellzahl x10 ⁹ /l (geometrischer Mittelwert mit Streufaktor)	
	Kontrollgruppe 3 (n=10)	Parvovirose-Gruppe (n=21)
CD5	2,64 $\pm$ 1,32	0,63 $\pm$ 2,95 *** (n=20)
CD4	1,59 $\pm$ 1,37	0,46 $\pm$ 3,22 ***
CD8	1,05 $\pm$ 1,28	0,21 $\pm$ 3,09***
CD21	1,12 $\pm$ 1,53	0,26 $\pm$ 4,62***

¹ geometrischer Mittelwert mit Streufaktor * $p \leq 0,05$ im Vergleich mit den Welpen *** $p \leq 0,001$ im Vergleich mit den Welpen

4.5.2 Kontrollgruppe 4 (Adulte Gruppe) vs. Patientengruppe 2 (Morbus Cushing-Gruppe)

Von den 29 Hunden der Morbus Cushing-Gruppe konnten bei 10 Tieren keine CD5+-Zellen nachgewiesen werden, so daß sie auch hier nicht mit in die statistische Auswertung einbezogen sind. Bei den Vergleichen der relativen Verteilung der Subpopulationen ist der höhere Anteil CD8+-Zellen bzw. der niedrigere Anteil CD21+-Zellen bei den kranken Tieren schwach signifikant ($p=0,045$ bzw. $p=0,018$). Für die niedrigeren absoluten Zahlen ergeben sich signifikante bzw. hoch signifikante Veränderungen bei CD5abs. ($p=0,004$), CD4abs. ($p<0,001$) und CD21abs. ($p=0,001$). Der Abfall des CD4/CD8-Quotienten von 1,95 auf 1,44 ist dagegen nicht signifikant (Tab. 20).

4.5.3 Kontrollgruppe 4 (Adulte Gruppe) vs. Patientengruppe 3 (Leishmaniose-Gruppe)

Bei den Hunden der Leishmaniose-Gruppe war nur der Abfall der CD21abs. –Zellen von 0,31 auf 0,11 schwach signifikant ($p=0,015$). Die auffällige Erniedrigung der prozentualen Werte für das Antigen CD21 von 14,94 auf 7,53 ist jedoch nicht signifikant ($p=0,07$) (Tab. 21).

Tab. 20 Vergleich zwischen Kontrollgruppe 4 (Adulte Gruppe) und Patientengruppe 2 (Morbus Cushing-Gruppe); (angegeben jeweils der arithmetische Mittelwert mit Standardabweichung, bei CD21, den absoluten Werten und dem CD4/CD8 -Quotient der geometrischer Mittelwert mit Streufaktor)

Antigen	relative Verteilung in % (arithmetischer Mittelwert mit Standardabweichung)	
	Kontrollgruppe 4 (n=20)	Morbus Cushing-Gruppe (n=29)
CD5	81,01±10,73 (n=19)	84,36 ±9,03 (n=19)
CD4	47,75 ±7,81	46,24 ±15,52
CD8	26,28 ±9,83	34,39 ±15,62*
CD21	14,94 ±1,68 ¹	8,41 ±1,85* ¹
CD4/CD8	1,95 ±1,64 ¹	1,44 ±2,32 ¹

Antigen	absolute Zellzahl x10 ⁹ /l (geometrischer Mittelwert mit Streufaktor)	
	Kontrollgruppe 4 (n=20)	Morbus Cushing-Gruppe (n=29)
CD5	1,89 ±1,47 (n=19)	1,19 ±1,69 (n=19)**
CD4	1,13 ±1,45	0,60 ±1,66***
CD8	0,58 ±1,95	0,42 ±2,45
CD21	0,31 ±2,03	0,11 ±2,13***

¹ geometrischer Mittelwert mit Streufaktor * $p \leq 0,05$ im Vergleich mit den Kontrollgruppe 3 ** $p \leq 0,01$ im Vergleich mit Kontrollgruppe 3 *** $p \leq 0,001$ im Vergleich mit Kontrollgruppe 3

Tab. 21 Vergleich zwischen Kontrollgruppe 4 (Adulte Gruppe) und Patientengruppe 3 (Leishmaniose-Gruppe); (angegeben jeweils der arithmetische Mittelwert mit Standardabweichung, bei CD21, den absoluten Werten und dem CD4/CD8 -Quotient der geometrischer Mittelwert mit Streufaktor)

Antigen	relative Verteilung in % (arithmetischer Mittelwert mit Standardabweichung)	
	Kontrollgruppe 4 (n=20)	Leishmaniose-Gruppe (n=15)
CD5	81,01±10,73 (n=19)	83,91 ±7,16
CD4	47,75 ±7,81	52,25 ±13,25
CD8	26,28 ±9,83	30,60 ±8,60
CD21	14,94 ±1,68 ¹	7,53 ±2,73 ¹
CD4/CD8	1,95 ±1,64 ¹	1,71 ±1,66 ¹

Antigen	absolute Zellzahl x10 ⁹ /l (geometrischer Mittelwert mit Streufaktor)	
	Kontrollgruppe 4 (n=20)	Leishmaniose-Gruppe (n=15)
CD5	1,89 ±1,47 (n=19)	1,35 ±1,58
CD4	1,13 ±1,45	0,93 ±1,64
CD8	0,58 ±1,95	0,55 ±1,64
CD21	0,31 ±2,03	0,14 ±3,11*

¹ geometrischer Mittelwert mit Streufaktor * $p \leq 0,05$ im Vergleich mit den Kontrollgruppe 3

4.6 Patientengruppe 4 (Andere Erkrankungen)

Die Einzelergebnisse der 31 Patienten, die nicht eindeutig einer der 3 anderen Patientengruppen zugeordnet werden konnten, sind in der Tabelle 22 aufgeführt. Auffallend der hohe Anteil (3 von 4) „CD 5 negativen-Tiere“, die mit Leishmaniose-Verdacht von uns untersucht wurden (Tier Nr. AE8, AE10, AE11). Die beiden anderen „CD5 negativen-Hunde“ dieser zusammengefaßten Gruppe zeigten eine chronische Enteritis (AE1) bzw. eine Enteritis in Kombination mit einer Bronchitis (AE31). Bei den 2 Patienten AE 22 und AE 23 konnte, aufgrund des hohen Anteils CD21+-Zellen, die weiter Differenzierung eines malignen Lymphoms in ein B-Zell-Lymphom erfolgen. Der Lymphom-Patient AE 25 zeigte dagegen ein malignes T-Zell-Lymphom, ablesbar am hohen Anteil CD5+-Zellen.

Tab. 22 Relative und absolute Verteilung der einzelnen Hunde der Patientengruppe 4 (angegeben jeweils der Mittelwert der 3 parallel gemessenen Proben)

Tier-	Erkrankung	CD5		CD4		CD8		CD21	
		%	x10 ⁹ /l	%	x10 ⁹ /l	%	x10 ⁹ /l	%	x10 ⁹ /l
AE 1	chron. Enteritis	2,5	0,01	45,7	0,29	8,7	0,05	42,5	0,27
AE 2	chron. Enteritis	86,7	1,11	16,8	0,21	63,7	0,82	5,2	0,06
AE 3	chron. Enteritis	82,3	1,23	66,1	0,99	33,4	0,50	33,0	0,49
AE 4	chron. Enteritis	81,4	2,45	40,4	1,22	30,7	0,92	20,3	0,61
AE 5	chron. Enteritis	88,2	1,51	59,4	1,02	22,4	0,38	7,6	0,13
AE 6	häm. Enteritis	88,0	0,89	52,8	0,53	20,3	0,20	7,2	0,07
AE 7	häm. Enteritis	60,4	2,78	45,0	2,07	19,1	0,88	25,1	1,15
AE 8	Leishm.-Verdacht	0,2	0,01	54,5	1,50	13,8	0,38	20,5	0,56
AE 9	Leishm.-Verdacht	58,5	2,62	14,5	0,66	71,2	3,27	9,2	0,42
AE 10	Leishm.-Verdacht	2,7	0,03	53,9	0,74	33,8	0,46	5,5	0,07
AE 11	Leishm.-Verdacht	1,3	0,01	28,5	0,23	16,9	0,14	0,8	0,01
AE 12	Staupe-Verdacht	68,1	2,17	38,1	1,21	19,7	0,62	28,7	0,91

Tab. 22 (Fortsetzung)

Tier-	Erkrankung	CD5		CD4		CD8		CD21	
		%	x10 ⁹ /l	%	x10 ⁹ /l	%	x10 ⁹ /l	%	x10 ⁹ /l
AE 13	Staupe-Verdacht	78,7	1,89	42,4	1,02	22,7	0,54	18,2	0,43
AE 14	Staupe-Verdacht	58,4	1,82	36,7	1,14	18,1	0,56	40,2	1,25
AE 15	Staupe-Verdacht	81,3	1,93	55,9	1,33	15,9	0,37	16,1	0,38
AE 16	Staupevirusinfektion	71,8	0,55	40,1	0,31	22,2	0,17	12,0	0,09
AE 17	Staupevirusinfektion	36,5	2,19	19,1	1,15	27,8	1,67	55,1	3,32
AE 18	Demodikose	93,5	1,01	21,4	0,23	49,6	0,54	6,3	0,06
AE 19	Pyodermie	92,8	1,20	34,7	0,45	45,9	0,59	4,4	0,05
AE 20	Pyodermie	93,9	1,635	41,0	0,71	43,4	0,75	1,5	0,02
AE 21	Pyodermie	89,4	1,421	64,2	1,02	19,9	0,31	7,7	0,12
AE 22	malignes Lymphom	33,2	0,332	21,8	0,21	12,7	0,12	59,1	0,59
AE 23	malignes Lymphom	31,4	16,81	21,9	11,7	12,9	6,91	56,6	30,2
AE 24	malignes Lymphom	42,0	0,727	40,8	0,70	32,7	0,56	4,0	0,06
AE 25	malignes Lymphom	68,4	3,277	65,1	3,12	21,3	1,02	0	0
AE 26	Diabetes mellitus	86,0	1,136	47,8	0,63	35,3	0,46	12,1	0,16
AE 27	Plasmozytom	74,5	0,528	40,9	0,29	32,5	0,23	9,2	0,06
AE 28	Osteolyse	84,0	2,009	54,7	1,30	33,0	0,79	6,2	0,14
AE 29	chron. Bronchitis	87,5	1,636	39,5	0,73	51,6	0,96	6,2	0,11
AE 30	chron. Pankreatitis	95,1	1,256	67,0	0,88	27,0	0,35	9,2	0,12
AE 31	Enteritis/Bronchitis	2,4	0,108	60,3	2,74	20,8	0,94	15,0	0,68

5 DISKUSSION

5.1 Durchflußzytometrie

Die vorangestellten Ergebnisse zeigen, daß ein funktionierendes, schnelles und damit klinisch gut anwendbares Protokoll zur Messung von Lymphozytensubpopulationen entwickelt wurde. Da die Autoren der ersten Untersuchungen (HOFFMANN-FEZER et al., 1991; GEBHARD und CARTER, 1992; MOORE et al., 1992; VOSS et al., 1993; CHABANNE et al., 1995; DIRSCHERL et al., 1995; GREELEY et al., 1996; WILLIAMS, 1997; BOURDOISEAU et al., 1997) eine Dichte-Gradienten-Zentrifugation zur Gewinnung einer rein mononukleären Suspension voranstellten, war es nötig, ein geeignetes Protokoll zur Erythrozyten-Lyse zu finden, bei der auf eine zeitintensive Präparation verzichtet werden konnte. Die Lyse der Erythrozyten durch Inkubation (10 Sekunden) mit Aqua bidest. erweist sich dabei als voll zufriedenstellend, da sich die erhaltene Leukozytensuspensionen im Durchflußzytometer sehr gut differenzieren lassen. Hier nicht gezeigte Vorversuche ergaben, dass andere Lysereagenzien, längere bzw. kürze Inkubationszeiten oder ein anderes Antikoagulanzen (Heparin) zwar eine Differenzierung erlauben, jedoch unserem Protokoll deutlich unterlegen sind, da die Punkthistogramme des Zytometers sich wesentlich undifferenzierter darstellen. Dadurch erscheint eine genaue Abgrenzung der Lymphozyten schwieriger. Ein genauer Vergleich zwischen der von den meisten Autoren bisher hauptsächlich verwendeten Dichte-Gradienten-Präparation und der Vollblutlyse steht aber noch aus. BYRNE et al. (2000) und FALDYNA (2001) konnten bei Vergleichen zwar keine Unterschiede durch unterschiedliche Präparation der Zellen feststellen, bei der Katze wiesen DEAN et al. (1991) jedoch einen Effekt der unterschiedlichen Zellisolation auf die relative Verteilung von Lymphozyten nach (BYRNE et al., 2000; DEAN et al., 1991, FALDYNA et al. 2001). In immunphänotypischen Untersuchungen scheint die Beachtung der Präparation bzw. Herkunft der Zellen deshalb erforderlich. Nach den Richtlinien der NIAID (National Institute of Allergy and Infectious Diseases) ist die Vollblutlyse bei durchflußzytometrischen Untersuchungen in der Humanmedizin inzwischen als Standard vorgeschrieben (CALVELLI et al., 1993). Um einen Standard für durchflußzytometrische Messungen beim Hund zu entwickeln, erscheinen jedoch noch eine Reihe weiterer

Untersuchungen notwendig, damit eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleistet ist.

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte in der Vergangenheit sehr unterschiedlich. Während die meisten Autoren eine Darstellung und Vergleich der relativen Zahlen bevorzugten, bewerteten BOURDOISEAU et al. (1997) und CHABANNE et al. (1995) ihre Ergebnisse nur aufgrund der absoluten Zellzahlen. Nach den Richtlinien der NIAID ist zur Analyse von Lymphozyten durch Durchflußzytometrie in der Humanmedizin eine begleitende Messung der Leukozytenanzahl und des Differentialblutbildes zwingend vorgeschrieben (Calvelli et al., 1993). Für den Bereich der Veterinärmedizin empfehlen BYRNE et al. (2000) dieses Verfahren auch in klinischen Labors routinemäßig durchzuführen, um ein weiteres Hilfsmittel in der Bestimmung des Immunstatus, gerade von einzelnen Individuen zu besitzen. In der Medizinische und Gerichtliche Veterinärklinik werden die Hämatologiesysteme Technicon H*1 und ADVIA 120 schon einige Zeit zur Bestimmung der genauen Lymphozytenzahl in der Routinediagnostik eingesetzt. Sie geben einem die Möglichkeit, beide Formen der Ergebnisdarstellung parallel anzugeben.

5.2 Antigene

5.2.1 CD5-Antigen

Das CD5-Antigen wurde als T-Zell-Marker verwendet. Im Gegensatz zum Menschen und zu Nagern ist dieses Antigen beim Hund nicht auf B-Zellen vorhanden, so daß er als Pan-T-Zell-Marker schon bei anderen Autoren beschrieben wurde (COBBOLD und METCALFE 1994; RABANAL et al., 1995; WILLIAMS 1997; BYRNE et al., 2000). Der Anteil von durchschnittlich 81,01% CD5+-Zellen an den Lymphozyten bei gesunden erwachsenen Tieren liegt im Bereich der von BYRNE et al. (2000) und CHABANNE et al. (1995) veröffentlichten Zahlen (82,5% und 83,3%) für dieses Antigen (BYRNE et al., 2000; CHABANNE et al., 1995). Die bei vielen Tieren festgestellte Teilung der CD5+-Zellen in zwei Populationen bestätigen eine Vermutung von COBBOLD und METCALFE 1994, daß eine größere stark, und eine kleinere wenig Antigen-exprimierende Subpopulation existiert. Eine deutliche Trennung war in unseren Untersuchungen jedoch nicht bei allen Individuen möglich. Das Phänomen der „CD5 negativen-Hunde“ wurde bis jetzt noch von keinem Autor beschrieben. Selbst bei Wiederholungsmessungen der gleichen Patienten teilweise

über Monate können keine positiven Zellen bei diesen Tieren nachgewiesen werden. Es waren zwar überwiegend Morbus Cushing-Patienten (10 von 16) betroffen, einen direkten Zusammenhang zur klinischen Symptomatik konnten wir jedoch nicht herstellen. Es fällt aber auf, daß alle der bei uns mit diesem Phänomen stationär aufgenommenen Patienten sehr anfällig für Sekundärerkrankungen erschienen. Als Beispiel seien hier die Parvovirose-Patienten P16 und P17 angeführt, die als Geschwister gemeinsam in die Klinik kamen. Der Patient P16 konnte nach einer Woche intensiver Therapie entlassen werden, während der „CD5-negative“ -Patient P17 zusätzlich eine Pneumonie entwickelte und noch 4 Wochen nachbehandelt werden musste. Ähnlich kamen auch die Patienten AE8, AE10 und AE11 (Leishmaniose-Verdacht) in unsere Klinik und zeigten eine Reihe unterschiedlicher Symptome ohne genaue ätiologische Diagnose. Es scheint somit möglich, daß ein Fehlen des CD5 Antigens oder aber zumindest des vom mAk erkannten Epitops, einen Einfluss auf das Immunsystem besitzt. Zu beachten ist auch die Tatsache, daß ein klinisch völlig unauffälliger 4-jähriger Hund (A7), der auch in seiner Historie noch nie ernsthaft erkrankt war, dieses Phänomen zeigt. Inwiefern der von uns verwendete mAk (Klon 17-4-8) einen Einfluß auf dieses Phänomen hat, müsste noch geprüft werden. CHABANNE et al. (1995) und BYRNE et al. (2000) die mit anderen Klonen (YKIX302.9 und DH3B) das CD5-Antigen nachgewiesen haben, berichten nicht über CD5-negative T-Zellen.

5.2.2 CD4-Antigen, CD8-Antigen, CD21-Antigen

Die durch die mAk gegen die Antigene CD4, CD8 und CD21 erhaltenen Anteile positiver Lymphozyten (CD4: 47,75%; CD8: 26,28%; CD21: 14,94%) für gesunde erwachsene Tiere entsprechen denen von CHABANNE et al. (1995) und BYRNE et al. (2000) bereits beschriebenen (siehe Tab. 1). Abweichungen zu anderen Autoren verwundern nicht, da sehr viele verschiedene Referenzwerte angegeben werden (GEBHARD und CARTER 1992; MOORE et al. 1992; DIRSCHERL et al., 1995).

Der CD4/CD8 -Quotient liegt mit 1,95 im Bereich der von fast allen Autoren geschilderten Zahlen. Durch Vergleich mit der Arbeit von BYRNE et al. (2000) kann davon ausgegangen werden, daß durch Präparationsmethode, die Antikörper und das verwendete Durchflußzytometer EPICS® ELITE® Analyser (Fa. Coulter) Lymphozyten-Werte ermittelt werden, die als Kontrolle für den Vergleich mit kranken Tieren, als auch für den Vergleich mit anderen Autoren gut geeignet sind.

Aufgrund der Messung aus Vollblut konnte man parallel auch die Granulozytenfraktion mit untersuchen. Auffällig war der Mittelwert CD4+-Granulozyten der Parvovirose-Patienten von 36,55% am Tage der Erstuntersuchung in der Klinik. Nach 6 Tagen stieg der Mittelwert bei 11 von 21 Hunden auf 81,31% an (die anderen Tiere standen für eine Nachuntersuchung nicht mehr zur Verfügung). Dies läßt vermuten, daß das CD4-Antigen bei Granulozyten erst in einer späten Reifungsphase exprimiert wird, da auch der Anstieg der CD4+-Zellen parallel zur Erhöhung der Leukozytenzahl stattfand. Bei den anderen gemessenen Tieren schwankte der Anteil CD4+-Granulozyten in dem Bereich von 75%-90% (ohne merkliche Gruppenunterschiede). Vergleiche zu anderen Tierarten oder zum Menschen können leider nicht gezogen werden, da nur beim Hund bis jetzt CD4+-Granulozyten gefunden wurden.

5.3 Streuungszerlegung

Um den Einfluss einzelner Störfaktoren auf die erhaltenen Ergebnisse besser einschätzen zu können, wurden an Blutproben von 10 gesunden Beaglen Vorversuche durchgeführt. In einer ersten dreifaktoriellen hierarchischen Varianzanalyse sind die Standardabweichungen gegenüber dem Mittelwert der einzelnen Individuen, der labortechnischen Abweichungen und des Durchflußzytometers bestimmt worden (Tab 2). Die erhaltenen Standardabweichungen von bis zu 2% zeigen einen geringen Einfluss vom Durchflußzytometer auf das Ergebnis und sind zu vernachlässigen. Die labortechnischen Abweichungen sind nur für das Antigen CD5 mit 4,22% relativ hoch, vor allem da die Abweichungen der einzelnen Hunde mit 4,35% in einem ähnlichen Bereich liegen. Aufgrund der Berichte anderer Autoren waren große Unterschiede der Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut zwischen den einzelnen Individuen bekannt (CHABANNE et al., 1995; GREELY et al. 1996; FALDYNA 1998; BYRNE et al., 2000). Für die ersten 10 in dieser Arbeit gemessenen Beagle kann man dies nur zum Teil bestätigen. Die Abweichungen in dieser homogenen Gruppe von Tieren, die alle unter gleichen Haltungs- und Fütterungsbedingungen gehalten werden, sind nicht ganz so hoch, wie bei den Untersuchungen anderer Autoren. Um Abweichungen durch die Labortechnik in den anschließenden Untersuchungen weitgehend zu minimieren, wurden auch weiterhin alle Blutproben dieser Studie gedrittelt und parallel gemessen. Die Ergebnisse

zeigen, daß ein relativ stabiles, reproduzierbares System zur Analyse von caninen Lymphozytensubpopulation installiert werden konnte.

5.4 Lagerungsversuch

Zur Überprüfung des Einflusses der Blutprobenlagerung auf den Nachweis von Oberflächenantigenen wurde über 72 h ein Lagerungsversuch durchgeführt. Dabei sind die Blutproben der Beagle B7-B10 bei Zimmertemperatur gelagert und alle 24 h gemessen worden. Die erhaltenen Ergebnisse (Tab. 2) zeigen einen geringen Einfluß der Blutprobenlagerung im gemessenen Zeitraum. Sowohl für die relative Verteilung als auch Anzahl der absoluten Zellzahlen konnten, mit Ausnahme der CD21+-Zellen, keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden. Schwach signifikant war die leichte Erhöhung der CD21+-Zellen im Verlauf der Untersuchung. Dieses ist bei der Analyse von Blutproben zu beachten, die nicht am Tage der Blutentnahme bearbeitet werden können. Die Erhöhung bis zu maximal 3% sollte man jedoch auch nicht überbewerten, da sie sich im Rahmen der Schwankungen von Labortechnik und individuellen Tierunterschieden bewegen. Für alle andere Antigene können in einem Zeitraum von bis zu 72 h keine signifikanten Differenzen zwischen den einzelnen Messungen festgestellt werden. Diese Untersuchungen geben einem die Möglichkeit auch Blutproben mit in die Vergleiche einzubeziehen, die von praktizierenden Tierärzten eingeschickt wurden. Auch für die Zukunft lassen diese Ergebnisse vermuten, daß eine Überprüfung des immunologischen Status eines Patienten durch ein entferntes Labor mit Versendung einer Blutprobe gut möglich ist.

5.5 Vergleich Kontrollgruppe 2 (Beaglegruppe) vs. Kontrollgruppe 3 (Adulte Gruppe)

Im Unterschied zu der gemischten Kontrollgruppe 3 (Adulte Gruppe) zeigte die einheitlichen Gruppe der adulten, unter gleichen Fütterungs- und Haltungsbedingungen gehaltenen Beagle (Kontrollgruppe 2) einige Besonderheiten. Am deutlichsten war die Verschiebung des CD4/CD8-Quotienten von 1,95 der Adulten zu 1,03 der Beagle. Der Grund für die erniedrigte Anzahl CD4+-Zellen und der vermehrten Anzahl CD8+-Zellen, sowie der erniedrigte Anteil CD21+-Zellen kann nicht eindeutig benannt werden. Als Ursachen kommen Rasse-bedingte wie auch Haltungs-bedingte Unterschiede in Frage. Auch FALDYNA et al. (2001)

berichten über eine unterschiedliche Verteilung der einzelnen Subpopulationen bei verschiedenen Rassen. Dies ist auf jeden Fall in Untersuchungen zu berücksichtigen, da eine nicht korrekte Zusammenstellung von Kontrollgruppen, zum Beispiel bei rassedisponierten Erkrankungen, zu verfälschten Resultaten führen kann.

5.6 Vergleich der Kontrollgruppen mit den Patientengruppen

Die Auswahl der untersuchten Erkrankungen hatte unterschiedliche Hintergründe. Die Parvovirose wurde als Beispiel einer infektiösen und immunsuppressiven Erkrankung mit in die Untersuchung einbezogen, bei der die Gründe einer schon bekannten Immundefizienz näher betrachtet werden sollten. Beim Morbus Cushing der Hunde galt es die Wirkung der Hyperkortisolämie auf die Verteilung und Anzahl der Lymphozyten zu untersuchen. Besonders die bei fast allen erkrankten Tieren auffällige Lymphopenie sollte hinsichtlich ihrer Verteilung genauer betrachtet werden. Bei der Leishmaniose sind bis heute schon eine Reihe von Untersuchungen hinsichtlich der Lymphozytensubpopulationen bekannt. Ziel dieser Arbeit war es, die bisherigen Ergebnisse im Klinikalltag zu überprüfen und festzustellen, ob sie von diagnostischem oder prognostischem Wert sein könnten. Anschließend werden nun die einzelnen Krankheitsgruppen hinsichtlich der erhaltenen Ergebnisse dieser Untersuchungen diskutiert. Die Darstellung der Ergebnisse ist in der Vergangenheit sehr unterschiedlich gehandhabt worden. Während die meisten Autoren sich ausschließlich mit der Darstellung der relativen Verteilung begnügten, beziehen sich die Veröffentlichungen über die Leishmaniose nur auf absolute Zahlen. BYRNE et al. (2000) geben die Empfehlung für die Zukunft immer beide Möglichkeiten der Ergebnispräsentation zu wählen. Uns erscheint die Darstellung der relativen Verteilung eine bessere Vergleichbarkeit von Einzeltieren zu ermöglichen, da auch bei Kontrolltieren schon enorme Schwankungsbreiten auftreten. Aufgrund der bekannten, ebenfalls hohen Variabilität von Gesamtleukozyten- und Lymphozyten-Zahlen weisen die absoluten Werte noch höhere individuelle Variationen auf.

5.6.1 Kontrollgruppe 3 (Welpengruppe) vs. Patientengruppe 1 (Parvovirose-Gruppe)

Beim Vergleich der Parvovirose-Gruppe mit der Welpenkонтроllgruppe ist der große Unterschied zwischen den absoluten Zahlen der Lymphozytensubpopulationen sofort offensichtlich. Für alle Subpopulationen wurden hoch signifikant niedrigere Werte ermittelt. Die Gründe liegen in der starken Leuko- und auch Lymphopenie der Einzeltiere, die einerseits durch einen starken Zellverlust über das zerstörte Darmepithel herrühren, aber auch durch Zerstörung von Lymphozyten während der ersten Virämiephase der Virusinfektion. Inwieweit nun einzelne Subpopulationen stärker betroffen sind als andere, läßt sich durch eine Betrachtung der relativen Zahlen verdeutlichen. Der Anteil der zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen ist bei den erkrankten Tieren hoch signifikant niedriger als bei den gesunden Kontrolltieren. Dies führt gleichermaßen zu einem veränderten CD4/CD8-Quotienten, der von 1,51 schwach signifikant auf 2,24 ansteigt. Dies läßt vermuten, daß bei der virämischen Phase der Infektion und/oder dem Verlust von Lymphozyten auf der Darmschleimhaut zytotoxische T-Zellen stärker betroffen sind als andere Zellgruppen. Die Gründe dafür oder die genaue Aufgabe der CD8⁺-Zellen während einer Parvovirus-Infektion des Hundes sind aber nach wie vor unbekannt.

Vergleiche mit Parvovirus-Erkrankungen anderer Spezies erscheinen schwierig, da die klinischen Erscheinungen sehr von dem Krankheitsbild beim Hund abweichen. Bei der Maus ist allerdings bekannt, daß es durch eine Infektion mit dem „Aleutian Mink Disease Parvovirus“ (AMDV) zu einer Verdoppelung der Zahl CD8⁺-Zellen im peripheren Blut kommt. Die Anzahl CD4⁺-Zellen und B-Lymphozyten bleiben konstant (JACOBSEN et al., 1993). Bei Infektionen mit dem B19-Parvovirus beim Menschen werden in erster Linie CD4⁺-Zellen aktiviert, um die B-Zell-Antwort zu verstärken (VON POBLOTZKI et al., 1996). Gemeinsam ist allen Parvovirus-Infektionen eine große Bedeutung der humoralen Abwehr für den weiteren Krankheitsverlauf.

Im Verlauf einer Parvovirus-Infektion während eines Klinikaufenthaltes konnten keine eindeutigen Tendenzen festgestellt werden. So blieb die Verteilung der einzelnen Subpopulationen über diesen Zeitraum der Rekonvaleszenz relativ konstant (Ergebnisse nicht dargestellt). Auch der Vergleich der 6 verstorbenen Tiere mit den Überlebenden brachten keine Erkenntnisse. Viel aussagekräftiger für eine Einzeltierprognose erscheint nach wie vor die Gesamtanzahl der Leukozyten. So

hatten alle während unserer Studie verstorbenen Tiere die niedrigsten absoluten Zahlen an weißen Blutzellen.

5.6.2 Kontrollgruppe 4 (Adulte Gruppe) vs. Patientengruppe 2 (Morbus Cushing-Gruppe)

Um eine möglichst große Patientenanzahl in die Studie einfließen zu lassen, wurden auch zugeschickte Blutproben von praktizierenden Tierärzten mit untersucht. Einen Unterschied zwischen gelagerten und sofort bearbeiteten Proben aus der eigenen Klinik konnte nicht festgestellt werden (Kap 4.4). Die Ergebnisse zeigen für die Gruppe der erkrankten Hunde niedrigere Lymphozytenzahlen, die auch in der Literatur als ein wichtiges Merkmal eines Hyperadrenokortizismus beschrieben werden (NOTHELFER und WEINHOLD, 1992; FELDMAN und NELSON, 1994; NIEMAND und SUTER, 1994). Daraus resultieren niedrigere absolute Zellzahlen für die 4 von uns untersuchten Subpopulationen, die für CD4 bzw. CD21 hoch signifikant und für CD 5 signifikant sind. Durch einen signifikanten relativen Anstieg der CD8+-Zellen hebt sich der Effekt auf die absoluten Zahlen bei dieser Zellgruppe auf. Es kommt dadurch bedingt zu einem Absinken des CD4/CD8-Quotienten von 1,95 auf 1,44. Dies deckt sich mit den Erfahrungen, die in der Humanmedizin schon länger gemacht wurden. KRONFOL et al. (1996) zeigten für den Menschen ganz ähnliche Tendenzen. So veränderte sich das CD4/CD8-Verhältnis aufgrund erniedrigter CD4-Werte und erhöhter CD8-Werte signifikant von 2,58 auf 1,67 bei Erkrankten. Beim Hund kann somit in ähnlicher Weise angenommen werden, daß eine veränderte Zusammensetzung der peripheren Lymphozyten mit einer Beeinträchtigung der Immunregulation in Zusammenhang steht. Für die außergewöhnlich hohe Anzahl „CD5 negativen-Hunde“ (10 von 29) bei dieser Erkrankung konnte bis jetzt keine eindeutige Erklärung gefunden werden.

5.6.3 Kontrollgruppe 4 (Adulte Gruppe) vs. Patientengruppe 3 (Leishmaniose-Gruppe)

Der Vergleich von gesunden Tieren mit Hunden, die an Leishmaniose erkrankt waren, konnte die Ergebnisse von früheren Untersuchungen bestätigen. Einen schwach signifikanten Abfall der absoluten Zahl CD21+ B-Zellen konnte auch in

dieser Arbeit bestätigt werden, der Abfall der absoluten CD4+-Zellen ist jedoch nicht signifikant (BOURDOISEAU et al., 1997; MORENO et al., 1999). Beim Vergleich der relativen Verteilung der 4 Subpopulationen kommt es lediglich zu einer leichten Verschiebung von B-Zellen hin zu T-Zellen bei den erkrankten Tieren. Die relativen Zahlen wurden von MORENO et al. (1999) und BOURDOISEAU et al. (1997) nicht angegeben. Es fällt aber schwer, eine diagnostische oder prognostische Aussage daraus abzuleiten, da die Unterschiede zwischen kranken und gesunden Hunden relativ klein sind. Auch unter Berücksichtigung des klinischen Bildes fallen keine nennenswerten Differenzen auf. So erscheint es schwierig, die gefundenen Erkenntnisse hinsichtlich der verschiedenen Lymphozytensubpopulationen bei einer Leishmanien-Infektion zur Diagnose oder Prognose für ein Einzeltier heranzuziehen.

5.7 Diagnose und Prognose am Einzeltier

Die aus den Vergleichen von Kontrollgruppen mit den Krankheitsgruppen gewonnenen Erkenntnisse auf einzelne Individuen zu übertragen, ist nur bedingt möglich. Durch die große Streuung der Einzelergebnisse, ablesbar an den hohen Standardabweichungen, ist ein direkter Bezug für ein Einzeltier sehr schwierig. Auch der Versuch einen Zusammenhang mit der klinischen Situation der Einzeltiere herzustellen brachte keine objektiv bewertbaren Unterschiede. So zeigten aber nicht nur erkrankte Tiere diese große Streuung der Einzelergebnisse, sondern auch in der Gruppe der gesunden Kontrolltiere waren die Individualschwankungen sehr hoch. Eine Ausnahme bildete nur die sehr homogene Gruppe der untersuchten Beagle. Es erscheint notwendig den langfristigen Verlauf von Krankheiten bezüglich ihrer Immunzellen noch mehr in den Mittelpunkt weiterer Untersuchungen zu stellen. Erste stichprobenartige Messungen, die über den kurzen Zeitraum des Klinikaufenthaltes der Patienten durchgeführt wurden, zeigten sehr konstante Werte für die von uns untersuchten Lymphozytensubpopulationen (Ergebnisse nicht dargestellt). In der Humanmedizin werden Ergebnisse auch immer im längeren Verlauf betrachtet, um den Einfluss einer Erkrankung auf das Individuum nachzuweisen. Aus dem Anstieg bzw. Abfall CD4+-Zellen im peripheren Blut lässt sich über einen gewissen Zeitraum eine Aussagen über den weiteren Krankheitsverlauf ableiten (DANIEL, 1992). Bei Gruppenvergleichen gilt es in Zukunft noch einheitlichere Patientengruppen (Dauer der Erkrankung, Therapie, Stärke der Symptome) zu bilden, um die kleinen Unterschiede in der

Zusammensetzung der Blutzellen noch genauer in Bezug zur Erkrankung zu bringen. Für die Pathogeneseforschung könnten standardisierte Infektionsversuche neue Erkenntnisse bringen. Für die hohe Zahl der Hunde, bei denen durch unseren mAk gegen das CD5-Antigen keine positiven Lymphozyten nachzuweisen waren, konnten wir noch keine eindeutige Erklärung finden. Falls jedoch in Zukunft ein Fehlen des CD5-Antigens, bzw. des von unserem mAk erkannten Epitops, in Zusammenhang mit einer Immundefizienz zu bringen wäre, würde die Bestimmung dieser Lymphozytensubpopulation eine hervorragende Hilfe in der Diagnostik darstellen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war es ausgewählte Erkrankungen des Hundes, die bekanntermaßen mit einer Immunsuppression einhergehen (Hyperadrenokortizismus, Leishmaniose, Parvovirose), auf Veränderungen und Besonderheiten in der Zusammensetzung von verschiedenen Lymphozytensubpopulationen (CD5+/-, CD4+/-, CD8+/-, CD21+/- Zellen) im peripheren Blut zu untersuchen. Verschiedenen Kontrollgruppen dienten als Vergleich, da verwertbare Referenzangaben in der Literatur fehlten.

Gegenstand der Untersuchung waren eine gemischte adulte Kontrollgruppe (n=20), eine Welpengruppe (n=10), eine Beaglegruppe (n=10), sowie 29 Hyperadrenokortizismus-, 15 Leishmaniose-, 21 Parvovirose-Patienten und 31 Hunde mit unterschiedlichen Krankheitsbildern.

Eine Lyse der Erythrozyten durch Inkubation (10 Sekunden) mit Aqua destillata erwies sich als ein voll zufriedenstellendes Verfahren zur Herstellung von Leukozytensuspensionen, welche eine schnelle und reproduzierbare Immunphänotypisierung durch ein Durchflußzytometer erlaubt.

Die Mittelwerte für die relative Verteilung der untersuchten Zellgruppen bei gesunden adulten Tieren waren für das CD5-Antigen 81,01%, das CD4-Antigen 47,75%, das CD8-Antigen 26,28% und das CD21-Antigen 14,94% der Gesamtlmphozyten. Der CD4/CD8-Quotient betrug 1,94. Bei gesunden Welpen (Hunde < 6 Monate) zeigte sich folgende Verteilung: CD5 66,93%, CD4 40,36%, CD8 26,76%, CD21 27,98%, CD4/CD8-Quotient 1,51.

Bei den meisten Hunden konnten zwei, das Antigen CD5 unterschiedlich stark exprimierende Gruppen von Lymphozyten nachgewiesen werden. Eine hohe Anzahl (16 von 96) der untersuchten Patienten zeigte überhaupt keine Expression des CD5-Antigens bzw. des vom verwendeten monoklonalen Antikörper (Klon 17-4-8) erkannten Epitops.

Parvovirose- Patienten hatten im Vergleich mit den Welpen einen hoch signifikant niedrigeren Anteil CD8+/- Zellen. Die Anzahl CD5+/-, CD4+/-, CD8+/- und CD21+/- Lymphozyten war bei den erkrankten Hunden hoch signifikant niedriger.

Bei den Hyperadrenokortizismus-Patienten kam es zu einem signifikanten Anstieg des Anteils CD8+Lymphozyten im peripheren Blut. Die Anzahl CD5+-, CD4+- und CD21+-Lymphozyten sank bei erkrankten Tieren signifikant bzw. hoch signifikant ab.

Leishmaniose-Patienten zeigten einen signifikanten Abfall der Anzahl CD21+-Zellen im peripheren Blut. Die relative Verteilung der einzelnen Subpopulationen bleibt im Rahmen einer Leishmaniose-Infektion bestehen.

Mit der in dieser Arbeit gewählten Methode lassen sich periphere Lymphozyten schnell und reproduzierbar charakterisieren. Sehr hohe Individualschwankungen bei gesunden wie auch bei kranken Hunden machen beim Einzeltier einen direkten Bezug der relativen bzw. auch absoluten Verteilung von Lymphozyten zum klinischen Bild aber sehr schwierig. Zum jetzigen Zeitpunkt erscheint es schwierig die gefundenen Besonderheiten in der Zusammensetzung der Lymphozytensubpopulationen für den Klinikalltag zu verwerten.

7 SUMMARY

Aim of this study was to characterize changes or abnormalities in the composition of lymphocyte subsets (CD5+-, CD4+-, CD8+-, CD21+-cells) in the peripheral blood of dogs with certain diseases who are known to be associated with immunosuppression (Hyperadrenocorticism, Leishmaniosis, Parvovirosis). As adequate reference values were not published, several control groups were used for comparison.

A mixed adult control group (n=20), a puppy group (n=10), a beagle group (n=10), as well as patients with Hyperadrenocorticism (n=29), Leishmaniosis (n=15), Parvovirosis (n=21) and a group with different other diseases (n=31) were examined.

Lysis of erythrocytes by incubation (10 seconds) with aqua destillata was a fully satisfying method to produce a leucocyte suspension, which could be used for fast and reproducible immunophenotyping by flow cytometry.

Mean percentages of the examined cell groups in the healthy adult animals group were for the CD5-Antigen 81,01%, the CD4-Antigen 47,75%, the CD8-Antigen and the CD21-Antigen 14,94% of total lymphocytes. The CD4/CD8 ratio was 1,94. The percentages for healthy puppies (dogs < 6 month) were: CD5 66,93%, CD4 40,36%, CD8 26,76%, CD21 27,98%, CD4/CD8-Ratio 1,51.

Most dogs showed two different groups of lymphocytes, with a varying degree of CD5-Antigen expression. A high amount (16 of 96) of patients did not show any expression of the CD5-Antigen respectively the epitop recognized by our monoclonal antibody (clone 17-4-8).

Parvovirosis patients had a highly significant lower percentage of CD8+-cells in comparison to the puppies. The amount of CD5+-, CD4+-, CD8+- und CD21+-lymphocytes for the diseased animals was highly significant lower.

The hyperadrenocorticism patients showed a significant increase in the percentage of CD8+-cells. The amount CD5+-, CD4+- and CD21+-lymphocytes in the group of diseased animals was significant respectively highly significant lower.

Leishmaniosis patients showed a significant decrease in the total amount CD21+-cells in the peripheral blood. During a leishmaniosis infection the percentage of lymphocyte subpopulations did not change.

With the method used in this study it is possible to characterize canine lymphocytes in peripheral blood fast and reproducible. Because of high individual deviations in diseased and healthy dogs it is difficult to refer percentage or total number of lymphocyte subsets to the clinical situation of an individual patient. At the present time it appears difficult that the deviations described in this investigation can be of clinical use.

8 SCHRIFTTUMVERZEICHNIS

ARBER, D.; WEISS, L. (1995):

CD5 A Review.

Immunohistochemistry, 3, 1-22.

ARLIAN, L.G.; RAPP, C.M.; STEMMER, B.L.; MORGAN, M.S.; MOORE, P.F. (1997):

Characterization of lymphocyte subtypes in scabietic skin lesions of naive and sensitized dogs.

Vet.Parasitol., 68, 347-358.

BERNARD, A; BOUMSELL, L. (1984):

The clusters of differentiation (CD) defined by the First International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens.

Hum. Immunol., 11 (1): 1-10.

BIKAH, G.; LYND, F.M.; ARUFFO, A.A.; LEDBETTER, J.A.; BONDADA, S. (1998):

A role for CD5 in cognate interactions between T cells and B cells, and identification of a novel ligand for CD5.

Int.Immunol., 10, 1185-1196.

BOGDAN, C. (1998):

[Leishmaniasis: principles of the immune response and function of nitric oxide].

Berl.Munch.Tierarztl.Wochenschr., 111, 409-414.

BOURDOISEAU, G.; BONNEFONT, C.; HOAREAU, E.; BOEHRINGER, C.; STOLLE, T.; CHABANNE, L. (1997):

Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally Leishmania infantum-infected treated and untreated dogs.

Vet.Immunol.Immunopathol., 59, 21-30.

BOURDOISEAU, G.; BONNEFONT, C.; MAGNOL, J.P.; SAINT-ANDRE, I.; CHABANNE, L. (1997):

Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis.

Vet.Immunol.Immunopathol., 56, 345-351.

BRADSTOCK, K.F. (1993):

The diagnostic and prognostic value of immunophenotyping in acute leukemia.

Pathology., 25, 367-374.

BREUER, W.; STAHR, K.; MAJZOUN, M.; HERMANN, W. (1998):

Bone-marrow changes in infectious diseases and lymphohaemopoietic neoplasias in dogs and cats--a retrospective study.

J.Comp.Pathol., 119, 57-66.

BYRNE, K.M.; KIM, H.W.; CHEW, B.P.; REINHART, G.A.; HAYEK, M.G. (2000):

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.

CALVELLI, T.; DENNY, T.N.; PAXTON, H.; GELMAN, R.; KAGAN, J. (1993):

Guideline for flow cytometric immunophenotyping: a report from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Division of AIDS.

Cytometry, 14, 702-715.

CALVO, J.; PLACES, L.; PADILLA, O.; VILA, J.M.; VIVES, J.; BOWEN, M.A.; LOZANO, F. (1999):

Interaction of recombinant and natural soluble CD5 forms with an alternative cell surface ligand.

Eur.J.Immunol., 29, 2119-2129.

CANIATTI, M.; ROCCABIANCA, P.; SCANZIANI, E.; PALTRINIERI, S.; MOORE, P.F. (1996):

Canine lymphoma: immunocytochemical analysis of fine-needle aspiration biopsy.

Vet.Pathol., 33, 204-212.

CARROLL, M.C. (1998):

CD21/CD35 in B cell activation.

Semin.Immunol., 10, 279-286.

CARTER, L.L.; DUTTON, R.W. (1996):

Type 1 and type 2: a fundamental dichotomy for all T-cell subsets.

Curr.Opin.Immunol., 8, 336-342.

CASAL, J.I. (1999):

Use of parvovirus-like particles for vaccination and induction of multiple immune responses.

Biotechnol.Appl.Biochem., 29 (Pt 2), 141-150.

CASWELL, J.L.; YAGER, J.A.; PARKER, W.M.; MOORE, P.F. (1997):

A prospective study of the immunophenotype and temporal changes in the histologic lesions of canine demodicosis.

Vet.Pathol., 34, 279-287.

CHABANNE, L.; FOURNEL, C.; CAUX, C.; BERNAUD, J.; BONNEFOND, C.; MONIER, J.C.; RIGAL, D. (1995):

Abnormalities of lymphocyte subsets in canine systemic lupus erythematosus.

Autoimmunity., 22, 1-8.

CHABANNE, L.; MARCHAL, T.; DENEROLLE, P.; MAGNOL, J.P.; FOURNEL, C.; MONIER, J.C.; RIGAL, D. (1995):

Lymphocyte subset abnormalities in German shepherd dog pyoderma (GSP).

Vet.Immunol.Immunopathol., 49, 189-198.

COBBOLD, S.; METCALFE, S. (1994):

Monoclonal antibodies that define canine homologues of human CD antigens: summary of the First International Canine Leukocyte Antigen Workshop (CLAW).

Tissue Antigens., 43, 137-154.

DANIEL, V. (1992):

Klinisch relevante Anwendungen der Durchflußzytometrie.

GIT, Labor-Medizin, 1-2, 27-30

DE LUNA, R.; VUOTTO, M.L.; IELPO, M.T.; AMBROSIO, R.; PIANTEDOSI, D.; MOSCATIELLO, V.; CIARAMELLA, P.; SCALONE, A.; GRADONI, L.; MANCINO, D. (1999):

Early suppression of lymphoproliferative response in dogs with natural infection by *Leishmania infantum*.

Vet.Immunol.Immunopathol., 70, 95-103.

DEAN, G.A.; QUACKENBUSH, S.L.; ACKLEY, C.D.; COOPER, M.D.; HOOVER, E.A. (1991):

Flow cytometric analysis of T-lymphocyte subsets in cats.

Vet.Immunol.Immunopathol., 28, 327-335.

DIRSCHERL, P.; BEISKER, W.; KREMMER, E.; MIHALKOV, A.; VOSS, C.; ZIESENIS, A. (1995):

Immunophenotyping of canine bronchoalveolar and peripheral blood lymphocytes.

Vet.Immunol.Immunopathol., 48, 1-10.

EL ETREBY, M.F.; MULLER-PEDDINGHAUS, R.; BHARGAVA, A.S.;

TRAUTWEIN, G. (1980):

Functional morphology of spontaneous hyperplastic and neoplastic lesions in the canine pituitary gland.

Vet.Pathol., 17, 109-122.

FALDYNA, M. (1998):

Differential Antigens of Leukocytes of dog, cat, horse, pig and ruminants.

VET.MED.-CZECH, 43, 55-66.

FALDYNA, M.; LEVA, L.; KNÖTIGOVA, P.; TOMAN, M. (2001):

Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs – a flow cytometric study

Vet.Immunol.Immunopathol., 82, 23-37

FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. (1994):

Comparative aspects of Cushing's syndrome in dogs and cats.

Endocrinol.Metab.Clin.North Am., 23, 671-691.

FERRER, L. (1999):

Clinical aspects of canine leishmaniasis.

Canine Leishmaniasis: an update.

Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum Barcelona, Spain
6-10.

FICKENSCHER, Y. (2001):

Hämatologiesystem ADVIA 120, Softwareadaptation und Evaluation bei der Tierart Hund.

Vet. Med. Diss., Giessen

FRANK, J.R.; BREITSCHWERDT, E.B. (1999):

A retrospective study of ehrlichiosis in 62 dogs from North Carolina and Virginia.

J.Vet.Intern.Med., 13, 194-201.

FRASCA, L.; PIAZZA, C.; PICCOLELLA, E. (1998):

CD4+ T cells orchestrate both amplification and deletion of CD8+ T cells.

Crit.Rev.Immunol., 18, 569-594.

GALKOWSKA, H.; WALDEMAR, L.O.; WOJEWODZKA, U. (1996):

Reactivity of antibodies directed against human antigens with surface markers on canine leukocytes.

Vet.Immunol.Immunopathol., 53, 329-334.

GARCIA, K.C.; SCOTT, C.A.; BRUNMARK, A.; CARBONE, F.R.; PETERSON, P.A.; WILSON, I.A.; TEYTON, L. (1996):

CD8 enhances formation of stable T-cell receptor/MHC class I molecule complexes [see comments] [published erratum appears in Nature 1997 Jun 5;387(6633):634].
Nature, 384, 577-581.

GEBHARD, D.H.; CARTER, P.B. (1992):

Identification of canine T-lymphocyte subsets with monoclonal antibodies.
Vet.Immunol.Immunopathol., 33, 187-199.

GILGER, B.C.; ANDREWS, J.; WILKIE, D.A.; WYMAN, M.; LAIRMORE, M.D. (1995):

Cellular immunity in dogs with keratoconjunctivitis sicca before and after treatment with topical 2% cyclosporine.
Vet.Immunol.Immunopathol., 49, 199-208.

GOTHE, R.; NOLTE, I.; KRAFT, W. (1997):

Leishmaniasis in dogs in Germany: epidemiological case analysis and alternatives to conventional causal therapy.
Tierarztl.Prax., 25, 68-73.

GRECO, D.S.; PETERSON, M.E.; DAVIDSON, A.P.; FELDMAN, E.C.; KOMUREK, K. (1999):

Concurrent pituitary and adrenal tumors in dogs with hyperadrenocorticism: 17 cases (1978-1995).
J.Am.Vet.Med.Assoc., 214, 1349-1353.

GREELEY, E.H.; KEALY, R.D.; BALLAM, J.M.; LAWLER, D.F.; SEGRE, M. (1996):

The influence of age on the canine immune system.
Vet.Immunol.Immunopathol., 55, 1-10.

GREENLEE, P.G.; CALVANO, S.E.; QUIMBY, F.W.; HURVITZ, A.I. (1987):

Investigation of cross-reactivity between commercially available antibodies directed against human, mouse, and rat lymphocyte surface antigens and surface markers on canine cells.
Vet.Immunol.Immunopathol., 15, 285-296.

GUPTILL, L.; SCOTT-MONCRIEFF, J.C.; WIDMER, W.R. (1997):

Diagnosis of canine hyperadrenocorticism.
Vet.Clin.North Am.Small.Anim.Pract., 27, 215-235.

HAHN, S.; GEHRI, R.; ERB, P. (1995):

Mechanism and biological significance of CD4-mediated cytotoxicity.
Immunol.Rev., 146, 57-79.

HALL, J.A.; WANDER, R.C.; GRADIN, J.L.; DU, S.H.; JEWELL, D.E. (1999):

Effect of dietary n-6-to-n-3 fatty acid ratio on complete blood and total white blood cell counts, and T-cell subpopulations in aged dogs.
Am.J.Vet.Res., 60, 319-327.

HEWICKER-TRAUTWEIN, M.; CARTER, S.D.; BENNETT, D.; KELLY, D.F. (1999):

Immunocytochemical demonstration of lymphocyte subsets and MHC class II antigen expression in synovial membranes from dogs with rheumatoid arthritis and degenerative joint disease.
Vet.Immunol.Immunopathol., 67, 341-357.

HOFFMANN-FEZER, G.; THUM, I.; HERBOLD, M.; ACKLEY, C.; MYSLIWETZ, J.; HARTMANN, K.; KRAFT, W. (1991):

[T-helper and T-suppressor lymphocyte subpopulations in the peripheral blood of spontaneously FIV-positive cats].
Tierarztl.Prax., 19, 682-686.

HOFFMANN-FEZER, G.; THUM, I.; HERBOLD, M.; ACKLEY, C.; MYSLIWETZ, J.; THEFELD, S.; HARTMANN, K.; KRAFT, W. (1992):

Decline in CD4+ cell numbers in cats with naturally acquired feline immunodeficiency virus infection.
J. Virol. 66, 1484-1488.

HOUSTON, D.M.; RIBBLE, C.S.; HEAD, L.L. (1996):

Risk factors associated with parvovirus enteritis in dogs: 283 cases (1982-1991).
J.Am.Vet.Med.Assoc., 208, 542-546.

JONES, R.D.; OFFUTT, D.M.; LONGMOOR (2000):

Capture ELISA and flow cytometry methods for toxicologic assessment following immunization and cyclophosphamide challenges in beagles.
Toxicol.Lett., 115, 33-44.

KEMENY, D.M.; NOBLE, A.; HOLMES, B.J.; DIAZ-SANCHEZ, D. (1994):

Immune regulation: a new role for the CD8+ T cell.
Immunol.Today, 15, 107-110.

KIMA, P.E.; SOONG, L.; CHICHARRO, C.; RUDDLE, N.H.; MCMAHON-PRATT, D. (1996):

Leishmania-infected macrophages sequester endogenously synthesized parasite antigens from presentation to CD4+ T cells.

Eur.J.Immunol., 26, 3163-3169.

KRAFT, W.; REUSCH, C. (1990):

Endokrine Organe. In: Kraft,W. Kleintierkrankheiten Band 1 Innere Medizin
2.Auflage Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart. 469-506.

KRONFOL, Z.; STARKMAN, M.; SCHTEINGART, D.E.; SINGH, V.; ZHANG, Q.; HILL, E. (1996):

Immune regulation in Cushing's syndrome: relationship to hypothalamic-pituitary-adrenal axis hormones.

Psychoneuroendocrinology., 21, 599-608.

LUCENA, R.; GINEL, P.J.; HERNANDEZ, E.; NOVALES, M. (1999):

Effects of short courses of different doses of prednisone and dexamethasone on serum third component of complement (C3) levels in dogs.

Vet.Immunol.Immunopathol., 68, 187-192.

LUCEY, D.R.; DORSKY, D.I.; NICHOLSON-WELLER, A.; WELLER, P.F. (1989):

Human eosinophils express CD4 protein and bind human immunodeficiency virus 1 gp120.

J.Exp.Med., 169, 327-332.

MARTINEZ-MORENO, A.; MARTINEZ-CRUZ, M.S.; BLANCO, A.; HERNANDEZ-RODRIGUEZ, S. (1993):

Immunological and histological study of T- and B-lymphocyte activity in canine visceral leishmaniosis.

Vet.Parasitol., 51, 49-59.

MCKENZIE, J.L.; FABRE, J.W. (1981):

Studies with a monoclonal antibody on the distribution of Thy-1 in the lymphoid and extracellular connective tissues of the dog.

Transplantation, 31, 275-282.

MILDE, K.F.; CONNER, G.E.; MINTZ, D.H.; ALEJANDRO, R. (1993):

Primary structure of the canine CD4 antigen.

Biochim.Biophys.Acta, 1172, 315-318.

MOORE, P.F.; ROSSITTO, P.V.; DANILENKO, D.M.; WIELENGA, J.J.; RAFF, R.F.; SEVERNS, E. (1992):

Monoclonal antibodies specific for canine CD4 and CD8 define functional T-lymphocyte subsets and high-density expression of CD4 by canine neutrophils. *Tissue Antigens.*, 40, 75-85.

MORENO, J.; NIETO, J.; CHAMIZO, C.; GONZALEZ, F.; BLANCO, F.; BARKER, D.C.; ALVA, J. (1999):

The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. *Vet.Immunol.Immunopathol.*, 71, 181-195.

MORITZ, A. (2000):

Der Einsatz lasergestützter Multiparameter-Hämatologiesysteme in der Veterinärmedizin

Habilitationsschrift, Justus-Liebig-Universität Gießen, 2000

MORITZ, A., PRINZINGER, S., BAUER, N. (2001) :

Die kanine viszerale Leishmaniose: Erreger, Infektion, Klinik, Diagnose, Therapie und Prophylaxe – eine Übersicht

Kleintierpraxis 46, 533-547

NICHOLS, R. (1990):

Concurrent illness and complications associated with canine hyperadrenocorticism. *Probl.Vet.Med.*, 2, 565-572.

NICHOLS, R. (1990):

Problems associated with medical therapy of canine hyperadrenocorticism. *Probl.Vet.Med.*, 2, 551-556.

NICHOLS, R. (1997):

Complications and concurrent disease associated with canine hyperadrenocorticism.

Vet.Clin.North Am.Small.Anim.Pract., 27, 309-320.

NIEMAND, H.G.; SUTER, P.F. (1994):

Praktikum der Hundeklinik, 24 Endokrine Erkrankungen, 8 Auflage, Blackwell-Wissenschafts-Verlag, Berlin.

NOLI, C. (1999):

Leishmaniose des Hundes.
Waltham Focus, 9, 16-23.

NOTHELFER, H.B.; WEINHOLD, K. (1992):

Formal pathogenesis, average age and breed distribution in the comparison of 61 Lysodren-treated and 36 untreated cases of canine hyperadrenocorticism which were dissected in the years 1975 to 1991 at the Institute for Veterinary Pathology of the Free University of Berlin.
Berl.Munch.Tierarztl.Wochenschr., 105, 305-311.

OLSEN, C.G.; STIFF, M.I.; OLSEN, R.G. (1984):

Comparison of the blastogenic response of peripheral blood lymphocytes from canine parvovirus-positive and -negative outbred dogs.
Vet.Immunol.Immunopathol., 6, 285-290.

**PAPPALARDO, B.L.; BROWN, T.; GEBHARDT, D.; SONTAKKE, S.;
BREITSCHWERDT, E.B. (30-6-2000):**

Cyclic CD8+ lymphopenia in dogs experimentally infected with Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii.
Vet.Immunol.Immunopathol., 75, 43-57.

**PINELLI, E.; GONZALO, R.M.; BOOG, C.J.; RUTTEN, V.P.; GEBHARD, D.; DEL
REAL, G.; RUITENBERG, E.J. (1995):**

Leishmania infantum-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner.
Eur.J.Immunol., 25, 1594-1600.

**PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DEL
REAL, G.; RUITENBERG, J. (1994):**

Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with Leishmania infantum.
Infect.Immun., 62, 229-235.

**PINELLI, E.; RUTTEN, V.P.; BRUYSTERS, M.; MOORE, P.F.; RUITENBERG, E.J.
(1999):**

Compensation for decreased expression of B7 molecules on Leishmania infantum-infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T-cell proliferation and gamma interferon production.
Infect.Immun., 67, 237-243.

PINELLI, E.; RUTTEN, V.P.; RUITENBERG, E.J. (1999):

Cellular immune responses in canine leishmaniasis.

Canine Leishmaniasis: an update.

Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum Barcelona, Spain 60-64.

RABANAL, R.M.; FERRER, L.; ELSE, R.W. (1995):

Immunohistochemical detection of canine leucocyte antigens by specific monoclonal antibodies in canine normal tissues.

Vet.Immunol.Immunopathol., 47, 13-23.

RINKARDT, N.E.; KRUTH, S.A.; KAUSHIK, A. (1999):

The effects of prednisone and azathioprine on circulating immunoglobulin levels and lymphocyte subpopulations in normal dogs.

Can.J.Vet.Res., 63, 18-24.

RIVAS, A.L.; KIMBALL, E.S.; QUIMBY, F.W.; GEBHARD, D. (1995):

Functional and phenotypic analysis of in vitro stimulated canine peripheral blood mononuclear cells.

Vet.Immunol.Immunopathol., 45, 55-71.

RUSLANDER, D.A.; GEBHARD, D.H.; TOMPKINS, M.B.; GRINDEM, C.B.; PAGE, R.L. (1997):

Immunophenotypic characterization of canine lymphoproliferative disorders.

In Vivo., 11, 169-172.

SAUER, J.; STALLA, G.K.; MULLER, O.A.; ARZT, E. (1994):

Inhibition of interleukin-2-mediated lymphocyte activation in patients with Cushing's syndrome: a comparison with hypocortisolemic patients.

Neuroendocrinology., 59, 144-151.

SCHUBERTH, H.J.; HADAM, M.; LEIBOLD, W. (1991):

Differentiation and transplantation antigens on the surface of mononuclear cells of cattle, horses and dogs.

Tierarztl.Prax., 19, 119-122.

SCHUBERTH, H.J.; RABE, H.U.; LANGE, A.; LEIBOLD, W. (1996):

Reactivity of monoclonal antibodies with bovine blood mononuclear cells activated by mitogens and superantigens.

Vet.Immunol.Immunopathol., 52, 313-321.

SCHUBERTH, H.J.; RABE, H.U.; LEIBOLD, W. (1998):

Reactivity of workshop monoclonal antibodies on paraformaldehyde-fixed porcine blood mononuclear cells.

Vet.Immunol.Immunopathol., 60, 409-417.

SCHUYLER, M.R.; GERBLICH, A.; URDA, G. (1984):

Prednisone and T-cell subpopulations.

Arch.Intern.Med., 144, 973-975.

SINKE, J.D.; THEPEN, T.; BIHARI, I.C.; RUTTEN, V.P.; WILLEMSE, T. (1997):

Immunophenotyping of skin-infiltrating T-cell subsets in dogs with atopic dermatitis.

Vet.Immunol.Immunopathol., 57, 13-23.

SLADE, J.D.; HEPBURN, B. (1983):

Prednisone-induced alterations of circulating human lymphocyte subsets.

J.Lab.Clin.Med., 101, 479-487.

SLAPPENDEL, R.J.; TESKE, E. (1999):

A review of canine leishmaniasis presenting outside endemic areas.

Canine Leishmaniasis: an update.

Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum Barcelona, Spain 54-59.

TEDDER, T.F.; ZHOU, L.J.; ENGEL, P. (1994):

The CD19/CD21 signal transduction complex of B lymphocytes.

Immunol.Today, 15, 437-442.

TESKE, E.; VAN HEERDE, P.; RUTTEMAN, G.R.; KURZMAN, I.D.; MOORE, P.F.;

MACEWEN, E.G. (15-12-1994):

Prognostic factors for treatment of malignant lymphoma in dogs.

J.Am.Vet.Med.Assoc., 205, 1722-1728.

TOMAN, M.; SVOBODA, M.; RYBNICEK, J.; KREJCI, J.; SVOBODOVA, V. (1998):

Secondary immunodeficiency in dogs with enteric, dermatologic, infectious or parasitic diseases.

Zentralbl.Veterinarmed.[B.], 45, 321-334.

TRAUTWEIN, G.; HEWICKER-TRAUTWEIN, M. (1994):

[Immunopathogenesis of virus diseases of cats and dogs].

Tierarztl.Prax., 22, 63-72.

TRUYEN, U. (1-9-1999):

Emergence and recent evolution of canine parvovirus.
Vet.Microbiol., 69, 47-50.

VAIL, D.M.; MAHLER, P.A.; SOERGEL, S.A. (1995):

Differential cell analysis and phenotypic subtyping of lymphocytes in bronchoalveolar lavage fluid from clinically normal dogs.
Am.J.Vet.Res., 56, 282-285.

VERNAU, W.; MOORE, P.F. (1999):

An immunophenotypic study of canine leukemias and preliminary assessment of clonality by polymerase chain reaction.
Vet.Immunol.Immunopathol., 69, 145-164.

VON POBLOTZKI, A.; GERDES, C.; REISCHL, U.; WOLF, H.; MODROW, S. (1996):

Lymphoproliferative responses after infection with human parvovirus B19.
J.Virol., 70, 7327-7330.

VOSS, C.; KREMMER, E.; HOFFMANN-FEZER, G.; SCHUMM, M.; GUNTHER, W.; KOLB, H.J.; THIERFELDER, S. (1993):

Identification and characterization of a mouse monoclonal antibody (M10) directed against canine (dog) CD8+ lymphocytes.
Vet.Immunol.Immunopathol., 38, 311-325.

VOß, C. (1995):

Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen canine (Hunde) T-Zellen.
Vet. Med. Diss. München

WATSON, C.J.; DAVIES, H.F.; COBBOLD, S.P.; RASMUSSEN, A.; REBELLO, P.R.; THIRU, S.; WALDMANN, H.; CALNE, R.Y.; METCALFE, S.M. (1995):

CD4 and CD8 monoclonal antibody therapy in the dog: strategies to induce tolerance to renal allografts.
Transplant.Proc., 27, 123-124.

WHITMIRE, J.K.; AHMED, R. (2000):

Costimulation in antiviral immunity: differential requirements for CD4(+) and CD8(+) T cell responses [In Process Citation].
Curr.Opin.Immunol., 12, 448-455.

WILLIAMS, D.L. (1997):

Studies of canine leucocyte antigens: a significant advance in canine immunology.
Vet.J., 153, 31-39.

**WUNSCHMANN, A.; ALLDINGER, S.; KREMMER, E.; BAUMGÄRTNER, W.
(1999):**

Identification of CD4+ and CD8+ T cell subsets and B cells in the brain of dogs with spontaneous acute, subacute-, and chronic-demyelinating distemper encephalitis.
Vet.Immunol.Immunopathol., 67, 101-116.

WÜNSCHMANN, A.; KREMMER, E.; BAUMGÄRTNER, W. (2000):

Phenotypical characterization of T and B cell areas in lymphoid tissues of dogs with spontaneous distemper.
Vet.Immunol.Immunopathol., 73, 83-98.

WÜNSCHMANN, A. (1996):

Phänotypische Identifizierung von Lymphozyten in lymphatischen Organen und im Gehirn von Hunden mit natürlicher Staupevirusinfektion.
Vet. Med. Diss., Gießen

YOUINOU, P.; JAMIN, C.; LYDYARD, P.M. (1999):

CD5 expression in human B-cell populations.
Immunol.Today, 20, 312-316.

9 DANKSAGUNG

Herrn HDoz. Dr. A. Moritz danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, sowie für die Anleitung und nette Betreuung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. E.-G. Grünbaum danke ich für die freundliche Aufnahme in der Medizinischen und Gerichtlichen Veterinärklinik in Gießen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Ch. Menge für die Einführung in die Methodik und die geduldige und unkomplizierte Hilfe bei der Erstellung und Korrektur dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer möchte ich für die freundliche Aufnahme am Institut für Mikrobiologie und die Bereitstellung des Durchflußzytometers danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. K. Failing und Herrn H. Heiter von der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung, die mir bei der Erstellung der statistischen Berechnungen eine große Hilfe waren.

Herrn Prof. Dr. W. Baumgärtner, Ph.D. danke ich für die Bereitstellung der benötigten primären Antikörper.

Herrn Dr. K. Laidinger, Fa. Biocontrol, Ingelheim möchte ich für die zuverlässige Vermittlung von Hyperadrenokortizismus-Patienten danken.

Herzlich danken möchte ich auch Ivonne und Maike für die „Organisation“ der Verbrauchsmaterialien und das nette Arbeitsklima im Keller.

Ein großes Dankeschön gilt allen meinen Freunden und Basketballkollegen, die zwar nicht immer zum zügigen Fortkommen dieser Arbeit beigetragen haben, aber mit denen ich während dieser Zeit viele unvergeßliche Stunden verbracht habe.

Meiner Familie und ganz besonders Ute danke ich für die liebevolle Unterstützung nicht nur bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Konsequent gegen die Dissertation gearbeitet hat nur meine Katze Moha, danke für die Gesellschaft.