

Einsatzmöglichkeiten der Durchflusszytometrie mittels FACS

Die Abkürzung FACS steht für **fluorescence-activated cell sorting**. Es handelt sich dabei um eine besondere Form der Durchflusszytometrie, bei der die mit Fluoreszenz-markierten Zellen gemessen und analysiert werden können. Die Zellen fließen in einem Flüssigkeitsstrom durch einen Laserstrahl und dabei werden Zellgröße, Innenstruktur und relative Intensität der Fluoreszenz bestimmt. Es stehen für zahlreiche Zelltypen, insbesondere Lymphozyten, Fluoreszenz-markierte Antikörper zur Verfügung, die sich gegen die immunphänotypischen Oberflächenmerkmale (Cluster of Differentiation, abgekürzt 'CD') der Zellen richten. Mittels dieser CD-Marker können nun die Zellen untersucht und näher identifiziert werden. Zytotoxische T-Zell Lymphozyten stellen sich zum Beispiel als CD3 und CD8 positiv dar, aber CD21 und CD4 negativ.

Diese Untersuchung wird in der Routinediagnostik insbesondere in der Hämatologie eingesetzt. Da das Untersuchungsmaterial in flüssiger Form vorliegen muss, eignen sich Blutproben besonders gut. Zur Gewährleistung eines aussagekräftigen Ergebnisses ist es wichtig, dass die Zellen intakt sind, daher sollte die Untersuchung schnellstmöglich, binnen maximal 3 Tagen durchgeführt werden. Bei Laboklin wird das FACS Gerät für verschiedene wichtige Untersuchungen eingesetzt.

1. Thrombozyten-Antikörper

Vermehrtes Immunglobulin (vorwiegend IgG) auf der Oberfläche von Thrombozyten führt zur vorzeitigen Phagozytose der Thrombozyten durch Makrophagen mit der Folge von Thrombozytopenie. Diese immun-medierte Thrombozytopenie (IMT) kann primär oder sekundär sein. Die seltene primäre Form wird hervorgerufen durch Autoantikörper, die gegen die thrombozytenspezifischen Epitope gerichtet sind. Die sekundäre immun-medierte Thrombozytopenie hingegen steht im Zusammenhang mit verschiedenen Medikamenten, infektiösen Erregern (Bakterien, Viren,

Protozoen oder Heminthen), Neoplasie und anderen immun-medierten Erkrankungen.

Die primäre IMT wird vorwiegend bei Hunden beobachtet, doppelt so häufig bei weiblichen wie bei männlichen Hunden, in allen Altersklassen, aber am häufigsten bei mittelalten Tieren. Prädisponierte Rassen sind dabei der Cocker Spaniel, Miniatur und Toy Pudel, Altenglischer Schäferhund (Bobtail), Golden Retriever sowie der deutsche Schäferhund.

Die gemessene Thrombozytenzahl ist in der Regel bei der primären IMT mit weniger als 30 G/l deutlich niedriger als bei der sekundären Form.

Die Diagnostik kann mittels FACS über einen Antithrombozyten-Antikörper-Nachweis durchgeführt werden. Dabei erfolgt eine Doppelinkubation zum Nachweis von an Thrombozyten gebundenem IgG. Antikörperspiegel von <15% gelten als negativ, während >30% als positiver Nachweis für IMT gewertet wird. Das Probenmaterial (EDTA Vollblut) darf dabei nicht älter als 3 Tage sein, um eine auswertbare Immunfärbung zu erzielen. Die Untersuchung muss vor Beginn der immun-suppressiven Therapie eingeleitet werden, da es sonst zu falsch-negativen Ergebnissen kommt. Weitere diagnostische Möglichkeiten sind die diagnostische Therapie mit Kortison sowie der Nachweis von megakaryozytärer Hyperplasie im Knochenmark.

2. Zellulärer Immunstatus

Der zelluläre Immunstatus beinhaltet ein großes Blutbild sowie die Bestimmung der relativen und absoluten Anzahl der peripheren Lymphozyten: B-Zellen, T-Zellen - gesamt sowie CD4+- (T-Helferzellen) und CD8+-Zellen (zytotoxische T-Zellen).

Die Immunphänotypisierung des Blutes beruht auf der selektiven Erkennung von Zelloberflächenantigenen durch Fluoreszenzfarbstoff-markierte monoklonale Antikörper mittels Durchflusszytometrie (FACS). Die Untersuchung des zellulären Immunstatus ist indiziert, wenn die klinische Symptomatik eine primäre oder sekundäre Störung im zellulären Immunsystem vermuten lässt.

Bei Hunden kann die Erstellung eines Immunstatus hilfreich für die Diagnose einer Pyodermie, Demodikose, eines systemischen Lupus erythematodes und einer Leishmaniose sowie angeborener T-Zelldefekte sein. Verlaufsuntersuchungen können bei medikamenteller Therapie zur Kontrolle und Dosisanpassung genutzt werden.

Bei Pferden dient er der Abklärung gehäufte und prolongierter Infekte.

Eine besondere Rolle spielt die Bestimmung des Immunstatus bei der Infektion mit dem **Felinen Immunschwäche Virus (FIV)**.

Das Virus verursacht chronisch-persistierende Infektionen mit einem progressiven Krankheitsverlauf. Durch die Infektion von immunkompetenten Zellen kommt es nach und nach zu einer Erschöpfung des Immunsystems.

Das Virus zeigt einen deutlichen Tropismus für T-Lymphozyten und Makrophagen. Hauptbetroffene von der Schädigung sind dabei die T-Lymphozytenfunktionen, wobei quantitative und auch qualitative Defekte der T-Helferzellpopulation vorherrschen. Zunächst führt ein Anstieg der CD8+-Zellen zu einem prozentualen Abfall der Anzahl CD4+-Zellen. Die Anzahl CD8+-Zellen bleibt über die asymptomatische Zeit der Infektion erhöht und sinkt erst relativ kurz vor Entwicklung klinischer Symptome ab. Zu Beginn der Infektion werden hauptsächlich CD4+-Zellen infiziert, hier finden sich dann auch die größten Virusmengen. Bei fortschreitender Infektion führt ein absoluter Abfall der CD4+-Zellen zu einer Verkleinerung des CD4+/CD8+-Quotienten.

Die humorale Immunabwehr zeigt erst relativ spät Schäden in ihrer Funktion. Ein Abfall der B-Zellanzahl findet meist erst im

finalen Stadium statt. Die Virusmenge im Blut steigt wieder deutlich an, eine Antikörperantwort findet aber nicht mehr statt.

Die Erstellung eines Immunstatus kann demzufolge eine Einschätzung der Prognose bei Vorliegen einer primären oder sekundären Immunschwäche geben.

3. Leukämiedifferenzierung

Bei einer Lymphozytose von > 30 G/l bzw. bei einer mittels Klonalitätsuntersuchung (PARR) bestätigten lymphoproliferativen Erkrankung (Leukämie, Lymphom Stadium V) mit einer Mindestleukozytenzahl > 5 G/l kann eine Leukämie-Differenzierung mittels FACS durchgeführt werden. Mittels Verwendung der CD-Marker zur Identifizierung der Zellen kann mit dieser Untersuchung eine Einteilung in akute bzw. chronische Leukämie erfolgen (CD34: Stammzellmarker), welche einen wichtigen Hinweis zur Prognose sowie Therapiewahl liefern kann. Des Weiteren können die neoplastischen Zellen in B-Zell sowie T-Zell Lymphozyten sowie Untertypen unterteilt werden.

Eine Differenzierung der myeloischen Leukämien mittels FACS ist mittlerweile auch bei Laboklin etabliert und kann insbesondere beim Auftreten von atypischen Blasten oder monozytären Zellen angewendet werden. Die Diagnose der akuten myeloischen Leukämie erfolgt ebenfalls über den CD34 Marker. Ähnlich der lymphatischen Form muss auch für die akute myeloische Leukämie eine schlechte Prognose (< 6 Monate) gestellt werden. Da die Klonalitätsuntersuchung auf lymphoproliferative Erkrankungen beschränkt ist, ist die Leukämie-differenzierung mittels FACS die einzige wenig invasive Untersuchungsmöglichkeit für myeloische Leukämien am peripheren Blut.

Allerdings ist bei den sogenannten leukämoiden entzündlichen Reaktionen, die aus einer hochgradigen Linksverschiebung, Neutrophilie und Monozytose bestehen, mit einer Gesamtleukozytenzahl von > 50 G/l, zunächst die klinische Untersuchung wichtig zum Nachweis einer pyogenen Infektion (z.B. Pyothorax, Pyometra, Peritonitis), immunmedierten Erkrankung (z.B. Glomerulonephritis, IMHA), Neoplasie, Gewebsnekrose oder eines Hyperöstrogenismus.