

Aus der Klinik für Pferde  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

# **Therapie des Sommerekzems mit Insol® Dermatophyton – eine Feldstudie**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Mag<sup>a</sup>.med.vet. Magdalena Brunner  
Tierärztin  
aus Passau

Berlin 2015  
Journal-Nr.: 3775

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Erster Gutachter: Univ.- Prof. Dr. Heidrun Gehlen  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Benedikt Kaufer  
Dritter Gutachter: Univ.- Prof. Dr. Rudolf Staufenberg

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

horses, eczema, vaccination, immunomodulation, antigen testing, ELISA,  
cytokines, clinical trials

Tag der Promotion: 17.02.2016

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-712-5

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2015**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2016

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

[verlag@menschundbuch.de](mailto:verlag@menschundbuch.de) – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

*Meiner Familie*



---

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Literaturübersicht</b> .....	<b>3</b>
2.1 Das Sommerekzem des Pferdes.....	3
2.1.1 Ätiologie und Pathogenese des Sommerekzems .....	3
2.1.2 Klinische Ausprägung .....	5
2.1.3 Diagnoseverfahren.....	8
2.1.3.1 Intrakutantest .....	8
2.1.3.2 In-vitro Tests .....	10
2.1.3.2.1 Nachweis von IgE .....	10
2.1.3.2.2 Funktioneller in-vitro Test (FIT).....	11
2.1.3.2.3 Cellular Antigen Stimulation Test (CAST).....	12
2.1.4 Therapiemöglichkeiten .....	15
2.1.4.1 Spezifische Immunotherapie (SIT).....	15
2.1.4.2 Andere Therapiemöglichkeiten .....	16
2.1.4.2.1 Homöopathika und Eigenbluttherapie.....	17
2.1.4.2.2 Insol® Dermatophyton .....	18
2.2 Allergieformen .....	20
2.3 Immunmodulation.....	25
2.3.1 Immunmodulation der Typ I-Allergie .....	26
2.3.1.1 Modulation der Th1- / Th2-Balance .....	26
2.3.1.2 Modulation von Effektorzellen.....	28
<b>3 Material und Methode</b> .....	<b>31</b>
3.1 Studiendesign und Ziele.....	31
3.2 Anamnesebögen .....	31
3.3 Patientengut .....	31

3.4	Studienablauf .....	32
3.5	Blutprobenentnahme .....	35
3.6	Injektion von Insol® Dermatophyton oder Placebo .....	35
3.7	Untersuchungen .....	35
3.7.1	Allgemeinuntersuchung.....	35
3.7.2	Sommerekzem-Score .....	36
3.7.3	Blutuntersuchungen .....	38
3.7.3.1	Funktioneller in-vitro Test (FIT).....	38
3.7.3.2	CAST .....	38
3.7.3.3	Zytokinbestimmung.....	38
3.7.3.3.1	Native Proben .....	38
3.7.3.3.2	Verdünnte Proben.....	41
3.8	Effekt der Insol® Dermatophyton Behandlung im Vergleich zum Vorjahr.....	43
3.9	Kotuntersuchung .....	43
3.10	Statistik.....	43
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>45</b>
4.1	Anamnesebögen .....	45
4.2	Untersuchungen .....	48
4.2.1	Allgemeinuntersuchung.....	48
4.2.2	Sommerekzemscore .....	48
4.2.2.1	Ergebnisse der Score-Untersuchung.....	48
4.2.2.2	Einfluss von Insol® Dermatophyton auf die klinische Ausprägung ..	52
4.2.3	Ergebnisse der Blut-Untersuchungen .....	58
4.2.3.1	Funktioneller in-vitro Test (FIT).....	58
4.2.3.1.1	FIT I.....	58
4.2.3.1.2	FIT II.....	60
4.2.3.1.3	FIT I und II im Vergleich.....	61
4.2.3.1.4	FIT I & II und Score im Vergleich.....	64
4.2.3.2	Cellular Antigen Stimulation Test (CAST).....	66

4.2.3.2.1	CAST I .....	66
4.2.3.2.2	CAST II .....	66
4.2.3.2.3	CAST I und II im Vergleich.....	67
4.2.3.2.4	CAST und klinische Ausprägung .....	68
4.2.3.3	Gegenüberstellung CAST vs. FIT .....	72
4.2.3.4	Zytokinbestimmung.....	74
4.2.3.4.1	Interleukin 1 .....	75
4.2.3.4.2	Interleukin 4 .....	79
4.2.3.4.3	Interleukin 10 .....	82
4.2.3.4.4	Interferon Gamma.....	85
4.2.3.4.5	Tumornekrosefaktor Alpha.....	89
4.2.3.4.6	Korrelation der Zytokinkonzentrationen und Scores .....	96
4.3	Effekt der Insol® Dermatophyton Behandlung im Vergleich zum Vorjahr.....	96
4.4	Kotuntersuchung .....	97
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>101</b>
5.1	Material und Methode.....	101
5.1.1	Auswahlkriterien.....	101
5.1.2	Allergietests.....	102
5.1.3	Zytokine.....	102
5.2	Ergebnisse .....	103
5.2.1	Score/Therapieerfolg.....	103
5.2.2	Allergietests.....	105
5.2.3	Zytokine.....	109
5.2.4	Effekt der Insol® Dermatophyton Behandlung im Vergleich zum Vorjahr.....	111
5.2.5	Kotuntersuchung .....	112
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>116</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>119</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>121</b>

---

<b>9</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>132</b>
9.1	Fragebogen zur Studie „Sommerexzem“ .....	132
9.2	Patientendaten .....	137
9.3	Allgemeinuntersuchung.....	139
9.4	Score .....	141
9.5	Statistisch vergleichende Auswertung der Scores der verschiedenen Untersuchungszeitpunkte .....	143
9.6	Besitzerfragebogen zum Effekt der Insol® Dermatophyton Behandlung im Vergleich zum Vorjahr .....	144
<b>10</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>147</b>
<b>11</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>149</b>
<b>12</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>151</b>
<b>13</b>	<b>Selbstständigkeitserklärung</b> .....	<b>153</b>

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
ad.us.vet.	zum tierärztlichen Gebrauch
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
ca.	zirka
cm	Zentimeter
d.h.	das heißt
DNS	Desoxyribonucleinsäure
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
et al.	und andere
ggr.	geringgradig
h	Stunde(n)
hgr.	hochgradig
HRT	Histamine-Release-Test
i.d.R.	in der Regel
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kg	Kilogramm
max.	Maximal
mgr.	mittelgradig
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
Nr.	Nummer
o.b.B.	ohne besonderen Befund
p	Signifikanzniveau
pg	Pikogramm

pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen Aktivität
spp.	Spezies
Tab.	Tabelle
Th	T-Helferzellen
TNF	Tumornekrosefaktor
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
v.a.	vor allem
var.	Varietät
z.B.	zum Beispiel

## 1 Einleitung

Das Sommerexzem (SE) des Pferdes, eine Typ I-Allergie gegenüber blutsaugender Insekten wie *Culicoides spp.* (BAKER und QUINN 1978; BRAVERMAN 1983; QUINN et al. 1983; ANDERSON 1991/1996; KUROTAKI 1994), ist eine nahezu weltweit verbreitete Erkrankung. Die klinischen Erscheinungen sind in Europa meist von Anfang März bis Ende Oktober zu beobachten. Leitsymptom ist ein stark bis extrem ausgeprägter Juckreiz, der die Pferde zum Scheuern bis hin zur Automutilation veranlasst. Fellverluste und teilweise großflächige nässende Bereiche der Haut bis hin zu tiefergehenden Wunden sind die Folge. Die erkrankten Tiere kommen nicht zur Ruhe und sind häufig während der Krankheitsphase nicht reitbar. Betroffen sind Pferde verschiedenster Rassen, unterschiedlichen Alters und Geschlechts, besonders jedoch Kleinpferderassen, v.a. Isländer. Es besteht eine genetische Disposition (STROTHMANN 1982; UNKEL 1985; MARTI 1992; LANGE 2004).

Obwohl das Sommerexzem bereits um 1840 (LECOQ 1842/1843) das erste Mal beschrieben wurde und schon seit langem intensiv untersucht wird, gibt es bis heute nur wenige therapeutische Ansätze gegen die Erkrankung. In den letzten Jahren wurde die Spezifische Immunotherapie (SIT) in einigen Studien bei Pferden mit SE untersucht (BARBET et al. 1990; ANDERSON et al. 1996). Da bisher jedoch keine hochreinen Allergene zur Verfügung stehen, waren die Erfolge begrenzt. Aus diesem Grunde kommt bis heute den prophylaktischen Maßnahmen zur Verminderung der Allergenexposition wie z.B. die Optimierung der Haltungsbedingungen, das Aufstallen der Pferde zu den Flugzeiten der *Culicoides* oder das Anlegen von Ekzemerdecken die größte Bedeutung zu. Eine weitere Schwierigkeit für eine adäquate Behandlung des SE bestand in der bislang problematischen Erstellung der Diagnose. Mit Hilfe von Intrakutantests wurden stark schwankende Ergebnisse erzielt (QUINN et al. 1983; HALLDORSOTTIR 1989; KOLM-STARK und WAGNER 2002; LEBIS et al. 2002), und auch die Bestimmung des IgE-Spiegels scheint nicht für eine zuverlässige Diagnostik des SE geeignet zu sein (UNGAR-WARON et al. 1990; WILSON et al. 2001/2006; WAGNER et al. 2003). Eine Verbesserung brachte der Einsatz des Histamine-Release-Tests (HRT), des FIT (Funktioneller in-vitro Test) und des CAST (Cellular Antigen Stimulation Test) (KAUL 1998; DE WECK und SANZ 2004; BASELGIA et al. 2006). Aus Gründen der weiten Verbreitung der Erkrankung, des Tierschutzes und nicht zuletzt wegen der wirtschaftlichen Bedeutung sind weitere, vor allem längerfristige kontrollierte Untersuchungen zur Diagnostik und Therapie erforderlich.

Für die vorliegende Felduntersuchung wurde ein Prophylaxe- bzw. Therapieprogramm mit dem Pilzimpfstoff Insol® Dermatophyton (ID) gewählt. Ansatzpunkte hierfür waren empirische Studien und positive Erfahrungsberichte praktizierender Tierärzte, die eine Verbesserung der Symptomatik bei an Sommerekzem erkrankten Tieren nach der Behandlung mit Insol® Dermatophyton feststellten. Dies wurde in einer in-vitro Studie von DRONOV und ROHWER (2007) bestätigt, die eine immunmodulatorische Wirkung des ID an equinen Lymphozyten nachweisen konnten.

Ziele dieser Arbeit waren im Einzelnen:

- Nachweis einer möglichen klinischen Wirkung von ID bei Sommerekzem.
- Nachweis einer möglichen immunmodulatorischen Wirkung von ID bei Sommerekzem.
- Darstellung eventuell vorhandener Unterschiede in der Behandlung von ID bei Sommerekzem zwischen Jung- (weniger als 2 Jahre Symptome) und Altekzemern (mehr als 2 Jahre Symptome).
- Vergleich der beiden in-vitro Allergietests FIT und CAST hinsichtlich ihrer Zuverlässigkeit in der Diagnostik des Sommerekzems.

---

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Das Sommerekzem des Pferdes

Die saisonal auftretende Dermatitis „Sommerekzem“ wurde bereits 1840 in französischen Berichten erwähnt (LECOQ 1842/43), ebenso war sie zu diesem Zeitpunkt bereits in Indien bekannt (DATTA 1839).

Mittlerweile ist das Sommerekzem eine weltweit bekannte Erkrankung mit einer vielfältigen Variation an Bezeichnungen (sweet itch, queensland itch, ardeurs, dermite estivale recidivane). Dabei wird von erkrankten Pferden der verschiedensten Rassen berichtet. Araber scheinen ebenso betroffen zu sein, wie z.B. Quarter Horses, englische Vollblüter, deutsches Kaltblut, Haflinger oder Islandpferde. Sogar bei Eseln und Maultieren wird das Sommerekzem beschrieben. Eine eindeutige Rassedisposition besteht dabei nicht. Islandpferde stellen jedoch in Deutschland eine der am stärksten betroffenen Rassen dar. Die Erkrankungshäufigkeit dieser Rasse wird in verschiedenen Untersuchungen zwischen 15 und 20 Prozent, für aus Island exportierte Tiere auf fast 25 Prozent geschätzt (UNKEL 1985). Andere berichten von bis zu 60-70 Prozent Erkrankungsrate exportierter Tiere (RÜSBÜLDT 1997). Dies erklärt die enorme wirtschaftliche Bedeutung des Sommerekzems speziell für die isländische Landwirtschaft, deren Exportquoten seit Mitte der achtziger Jahre nach bekannt werden dieser Zusammenhänge dramatisch sanken (UNKEL 1985).

Durch eine Studie an Islandpferden im Rheinland konnte gezeigt werden, dass das Sommerekzem multifaktoriell vererbt wird. Dabei wird allerdings eine Heritabilität von nur etwa 10 Prozent angenommen, wobei der Einfluss der Stute hier unerklärlicherweise größer zu sein scheint als der des Hengstes. Eine Disposition bezüglich Fellfarbe oder Geschlecht, wie von anderen Autoren vormals postuliert, konnte hier nicht nachgewiesen werden (UNKEL 1985).

#### 2.1.1 Ätiologie und Pathogenese des Sommerekzems

Dass es sich beim Sommerekzem um eine allergische Reaktion auf Stiche bestimmter blutsaugender Insekten handelt, wurde bereits 1954 von RIECK aufgrund von Untersuchungen in Australien geschlossen. Heute gilt es als gesichert, dass insbesondere *Culicoides spp.* (Gnitzen) weltweit als die bevorzugten Auslöser anzusehen sind. *Culicoides spp.* (Diptera, Familie: *Ceratopogonidae*) sind zwischen 0,5 und 3 mm große Mücken, die nahezu weltweit vorkommen und deren Gattung ca.

800 Spezies umfasst. Einige Arten dienen bestimmten Viren als Vektoren und können so Krankheiten wie die Blauzungenkrankheit und die Afrikanische Pferdepest übertragen. Nur weibliche Tiere bestimmter Arten beißen und legen ihre Eier anschließend im Wasser ab, wo die Larven nach einem Puppenstadium schließlich schlüpfen. LANGE (2004) fand heraus, dass sich die *Culicoides spp.* zur anschließenden Nahrungsaufnahme am Wirt meist nicht weiter als wenige 100 Meter von ihrer Brutstätte entfernen. *Culicoides spp.* sind in ihrer Aktivität und Verbreitung stark von klimatischen Bedingungen abhängig. Neben der Luft- und Bodenfeuchtigkeit sind bestimmte Mindesttemperaturen sowie eine geringe Windgeschwindigkeit Voraussetzungen, die die Mücken für ihre Aktivität und Fortpflanzung brauchen.

In Island kommen *Culicoides spp.* aufgrund der raueren klimatischen Bedingungen nicht vor. Aufgrund des Klimawandels findet aber eine Richtung Norden und in größere Höhen gerichtete Ausbreitung der Gnitzen statt (WITTMANN et al. 2001). PURSE et al. (2005) untersuchten die Expansion von *C.imicola*, die in den letzten Jahren eine Epidemie an Blauzungenkrankheit auslöste, 800 km weiter nördlich als bisher bekannt. Aber auch anderen Insektenarten wie z.B. *Stomoxys calcitrans* und *Simulium spp.* wird eine gewisse Bedeutung zugesprochen (HECK 1991). So wiesen BAKER und QUINN (1978) nach, dass auf die intradermale Applikation von Extrakten aus *Stomoxys calcitrans* und *Tabanidae* die Studienpferde mit einem subepidermalen Ödem und begrenzter Eosinophilie reagierten, ähnlich dem histopathologischen Bild des Sommerekzems. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen BRAVERMAN et al. (1983). Sie beobachteten bei Pferden mit Sommerekzem in Israel Reaktionen vom Soforttyp nach intradermaler Injektion von Extrakten aus *Stomoxys calcitrans* und *Culicoides imicola*, Reaktionen vom Spättyp allerdings nur bei *Culicoides imicola*. Es gelang ihnen außerdem Antikörper im Serum, sowohl bei gesunden als auch bei an Sommerekzem erkrankten Pferden, gegen die Extrakte der untersuchten *Culicoides*- und *Stomoxys*arten nachzuweisen.

Verschiedene Versuchsansätze zeigten, dass der dem Sommerekzem zugrunde liegende Pathomechanismus primär eine Hypersensibilisierungsreaktion vom Soforttyp (Typ I- Allergie) ist. Dies ergab sich zum einen aus Beobachtungen der klinischen Symptome, die sich beim überwiegenden Teil der intradermal mit *Culicoides*-Extrakten behandelten Pferde innerhalb einer halben Stunde einstellten (FADOK und GREINER 1990), zum anderen zeigten histopathologische Untersuchungen der Hautveränderungen deutlich erhöhte Zahlen an Mastzellen und eosinophilen Granulozyten sowie lokale Ödeme (KUROTAKI et al. 1994). Der Versuch, die für das Sommerekzem verantwortlichen Allergene von *Culicoides* genauer zu identifizieren,

indem aufgetrennte Fraktionen für intradermale Hauttests eingesetzt wurden, gelang nicht (MORROW et al. 1986). QUINN et al. (1983) konnten die Reaktionsbereitschaft der Haut auf *Culicoides*-Extrakte über das Serum erkrankter Tiere auf gesunde Pferde übertragen. Dies bestärkte den Verdacht, dass es sich beim Sommerexzem um eine Typ I- Allergie handelt. Dies folgerten auch STROTHMANN-LÜERSSSEN et al. (1992), die, in Übereinstimmung zur Flohbissallergie des Hundes und der saisonalen allergischen Dermatitis des Schafes, bei histologischen und biochemischen Untersuchungen von an Sommerexzem erkrankten Pferden sowohl eine Infiltration von eosinophilen Granulozyten, als auch einen Anstieg von entzündungs- und allergiespezifischen Leukotrienen in den veränderten Hautbereichen fanden. Die Ansammlung eosinophiler und neutrophiler Granulozyten und die Ödembildung nach intradermaler Applikation von *Culicoides*-Extrakt kann zudem durch die Histamin-1-Rezeptor Antagonisten Chlorphenamin und Mepyramin gehemmt werden (FOSTER et al. 1997). Zudem konnte in-vitro gezeigt werden, dass auch bei Equiden eine phänotypische Differenzierung von Th1- und Th2-Zellen möglich ist, also entsprechend dem humanen System eine Immundevidiation mittels Zytokinen auch in-vivo als möglich gelten darf (AGGARWAL 1999).

Anhand des von ihr entwickelten Funktionellen in-vitro Testes (FIT) gelang es KAUL (1998), eine spezifische Histaminausschüttung basophiler Granulozyten auf eine Stimulation mit *Culicoides nubeculosus* in Blutproben vorberichtlich Sommerexzem-positiver Pferde nachzuweisen, während Blutproben von Pferden ohne Sommerexzem nicht reagierten. Diese Ergebnisse konnten von KOBELT (2001) bestätigt werden. KOBELT wies zudem nach, dass die spezifische Sensibilisierung basophiler Granulozyten gegen *Culicoides* auch im Winter, außerhalb der klinischen Periode, erhalten bleibt.

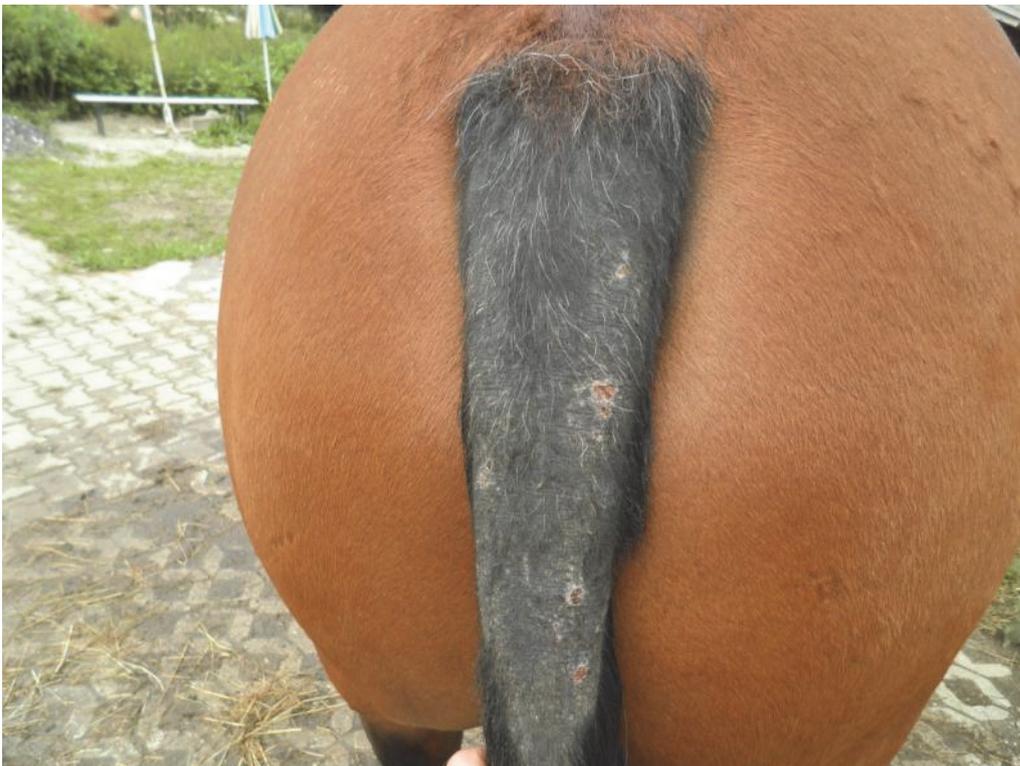
Untersuchungen von WILSON et al. (2001) zeigten, dass Pferde, die *Culicoides*-Bissen ausgesetzt waren, im Gegensatz zu naiven Pferden (in Island kommen *Culicoides* aufgrund der klimatischen Bedingungen nicht vor) Antikörper gegen Speicheldrüsenbestandteile gebildet hatten. Dabei konnten bei allen exponierten Pferden Immunglobuline vom Isotyp IgG nachgewiesen werden, IgE jedoch nur bei Pferden mit klinischen Symptomen des Sommerexzems.

### 2.1.2 Klinische Ausprägung

Zur klinischen Ausprägung des Ekzems kommt es nach UNKEL (1985) bei über 80 Prozent der untersuchten Islandpferde innerhalb der ersten drei Lebensjahre, 94

Prozent der späteren Sommerekzemer entwickeln bis zur Vollendung ihres vierten Lebensjahres erstmals Symptome. Fohlen allerdings zeigen nahezu nie Anzeichen der Erkrankung, obwohl z.T. schon bei Fohlen und Jährlingen eine Sensibilisierung basophiler Granulozyten nachgewiesen werden konnte (KOBELT 2001). Bei isländischen Importpferden kommt es nach Untersuchungen aus Norwegen frühestens im zweiten Sommer nach Import, im Durchschnitt nach etwa vier Jahren, zu ersten klinischen Ausprägungen (HALLDORSOTTIR und LARSEN 1991).

Im Laufe der Erkrankung werden fünf Stadien unterschieden. Auf das Prodromalstadium folgt das papulöse Stadium, gekennzeichnet durch stecknadelkopf- bis maximal drei Zentimeter im Durchmesser große Papeln, die einen lokalen Juckreiz auslösen, auf den die Pferde mit Unruhe und mehr oder weniger starkem Scheuern reagieren. Das Langhaar von Mähne und Schweif wird dabei bis zur Alopezie abgescheuert (Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Typischer Schweif („Rattenschwanz“) eines an SE erkrankten Pferdes.

Folgend kommt es im Exkoriationsstadium zuerst zu oberflächlichen Hautabschürfungen und in Folge weiterer Automutilation später zu tieferen, Cutis durchtrennenden Verletzungen. Es kann sich das sekundär infizierte oder ulcerierende Stadium anschließen. Letztendlich, mit Nachlassen der Allergenexposition, erfolgt im

Regenerationsstadium eine Abheilung der Hautveränderungen. Aufgrund des chronischen Verlaufs wird durch die permanente Reizung die Epidermis und Dermis jedoch stark zerstört. Es kommt, v.a. am Mähnenkamm und der Schweifrübe zur Pachydermie und andauernder Alopezie (Abbildung 2). Die vorgeschädigte Haut neigt auch außerhalb der Sommerexzempetode, insbesondere in den luftabgeschlossenen Falten der pachydermen Bereiche, zu bakteriellen und mykotischen Infektionen. (RÜSBÜLDT 2001).



**Abbildung 2:** „Elephantenhaut“ mit starkem Haarbruch und Alopezie am Mähnenkamm.

Die am häufigsten betroffenen Körperregionen sind Mähnenkamm und Schweifrübe (LANGE 2004), aber auch das Gesicht rund um die Augenpartie, Stirn, Hüfthöcker, Kruppe, dorsale Mittellinie, teilweise Rücken- und Halsbereich, sowie Bauchnaht und Schlauch bzw. Euter sind häufige Lokalisationen (RIECK 1953; BJÖRNSDOTTIR et al. 2006) (Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Verdickte und blutige Präputialgegend und Bauchnaht.

### 2.1.3 Diagnoseverfahren

#### 2.1.3.1 Intrakutantest

Der Intrakutantest (IKT) ist ein in-vivo Provokationstest zur Feststellung der allergischen Reaktionsbereitschaft eines Patienten auf ein bestimmtes Allergen. Hierbei wird eine geringe Menge eines Allergenextraktes in die Haut des Patienten injiziert. Nach bestimmten Zeitabschnitten wird die Reaktion der Haut auf den injizierten Extrakt in Form von Quaddelbildung, Rötung und Schwellung beurteilt, wobei zusätzlich eine Positivkontrolle (Histaminlösung) wie auch eine Negativkontrolle (physiologische NaCl-Lösung) mitgeführt wird. Bis zum heutigen Zeitpunkt liefern die Studien zum Intrakutantest jedoch stark variierende, teils gegenteilige Ergebnisse. Des Weiteren sind Kreuzreaktionen bei groben Allergenpräparationen möglich und darüber hinaus besteht die Gefahr der Allergisierung des Patienten gegen das injizierte Antigen. Dies alles sind limitierende Faktoren des IKT und machen dessen Einsatz in der Allergiediagnostik sehr umstritten.

QUINN et al. (1983) untersuchten Pferde mit und ohne Sommerekzem auf ihre Reaktion im Intrakutantest, in dem sie Extrakte von *Culicoides*, *Stomoxys*, *Tabanidae*

und *Culex-Arten* einsetzten. Es zeigte sich, dass zwar alle erkrankten Pferde sehr stark auf den *Culicoides*-Extrakt reagierten, jedoch auch drei der sechs gesunden Tiere. Die durch den *Culicoides*-Extrakt hervorgerufenen Reaktionen waren jedoch bei den Pferden mit Sommereczem nach 20 bzw. 60 Minuten signifikant stärker. Zu vergleichbaren Ergebnisse kamen HALLDORSOTTIR et al. (1989), wobei die Reaktionen auch von der Konzentration des injizierten Antigens abhingen.

Dies konnte auch von KOLMSTARK und WAGNER (2002) an 81 Islandpferden in Österreich mit einem standardisierten Extrakt von *C. variipennis* in den Konzentrationen von 1:50.000, 1:25.000 und 1:10.000 beobachtet werden. Während bei den beiden niedrigeren Konzentrationen eine Reaktion sowohl bei gesunden Pferden als auch bei Pferden mit SE überwiegend negativ bzw. auch falsch positiv ausfiel, reagierten bei der höheren Konzentration von 1:10.000 eine große Anzahl von gesunden Pferden (24 von 38) wie auch eine mittlere Anzahl von kranken Tieren (13 von 43) positiv. Diese Divergenz zwischen den Ergebnissen des Intrakutantests und den klinischen Befunden, falsch positive und negative Ergebnisse, positive Ergebnisse bei Negativkontrollen und eine mäßige Wiederholbarkeit der Testergebnisse bestätigten LEBIS et al. (2002).

MORRIS und LINDBORG (2003) untersuchten die Bedeutung der Antigenkonzentration für eine zuverlässige Diagnose des Sommereczems und empfahlen für *C. nubeculosus* eine Konzentration von 1:10.000 beim Einsatz im Intrakutantest. Sie ermittelten für neun von 13 untersuchten verschiedenen Allergenextrakten „irritierende“ Konzentrationen, bei denen Reaktionen auch bei gesunden Pferden hervorgerufen werden konnten. Ein anderes Testverfahren praktizierten FERROGLIO et al. (2006) bei ihrer Untersuchung von 18 Pferden mit Sommereczem bzw. 23 gesunden Pferden. Sie injizierten den Tieren 0,1 ml eines sterilen *Culicoides*-Extraktes in der Konzentration von 25 µg/µl sowie ebenfalls je 0,1 ml Histamin (1:10.000) als Positiv- und physiologische NaCl- Lösung als Negativkontrolle. Gleichzeitig wurde das Serum der Pferde mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht. Eine Schwellung von mindestens 1 cm bei gleichzeitiger Verdickung der Haut um > 10 Prozent nach 24 Stunden ist laut den Autoren als aussagekräftiger Grenzwert zwischen dem positiven Befund SE und einem entsprechenden negativen Ergebnis anzusehen. Sie benannten eine Sensitivität und Spezifität des Intrakutantestes von 100 Prozent, selbst bei einer Durchführung im Winter bei symptomfreien Pferden.

### 2.1.3.2 *In-vitro* Tests

In-vitro Tests haben, im Gegensatz zu in-vivo Tests, den großen Vorteil, dass die Allergisierung des Patienten unterbleibt und dass lediglich eine geringe Menge Blut abgenommen werden muss. Mögliche Untersuchungsmethoden sind zum einen die Messung des Serum-IgE-Spiegels mittels ELISA und zum anderen funktionelle Tests, welche die Allergiebereitschaft auf der Ebene der Effektorzellen ermitteln. Hierbei wird die Freisetzung präformierter (Histamin) und neu synthetisierter (Sulphidoleukotrienen (sLT)) Mediatoren durch die mit einem Allergen aktivierten basophilen Granulozyten des Patienten geprüft.

#### 2.1.3.2.1 Nachweis von IgE

Erst in den letzten Jahren ist es gelungen, monoklonale anti-equine IgE-Antikörper herzustellen, wodurch der spezifische Nachweis von equinem Serum-IgE immunhistologisch, mittels Western Blot oder ELISA erst möglich wurde. So produzierten WAGNER et al. (2003) monoklonale Antikörper mit einer Spezifität für verschiedene Epitope der schweren Kette des nativen equinen IgE-Moleküls und WILSON et al. (2006) solche mit einer Spezifität für natives equines IgE, von denen sie zwei in einem neu entwickelten ELISA zur Quantifizierung equinen IgEs im Serum einsetzten. Die Aussagekraft der Bestimmung des Serum-IgE-Spiegels für die Diagnostik von Typ I-Allergien wird in der Humanmedizin jedoch zunehmend als nicht ausreichend angesehen.

Als Gründe hierfür gelten:

1. Teilweise fehlender Nachweis allergenspezifischen IgEs trotz ausgeprägter allergischer Symptome.
2. Häufig fehlende Korrelation zwischen dem Ausprägungsgrad der klinischen Symptomatik und der Höhe des IgE-Spiegels.
3. Die Abhängigkeit des Serum-IgE-Spiegels von der Intensität der Allergenexposition und
4. die Tatsache, dass auch bei Individuen ohne allergische Symptome eine stark variierende IgE-Konzentration im Serum vorhanden sein kann (GEHLHAR et al. 1999; MIMURA et al. 2004).

Inwieweit diese Erkenntnisse vom Menschen auf das Pferd übertragen werden können, ist noch nicht geklärt. Es gibt jedoch Hinweise, dass auch die Bestimmung der equinen

IgE-Serumspiegel nicht für eine zuverlässige Diagnostik des Sommerekzems und anderer allergischer Erkrankungen geeignet ist. So fanden UNGAR-WARON et al. (1990) keinen schlüssigen Beweis für einen Zusammenhang zwischen dem Ausprägungsgrad klinischer Symptomatik des SE beim Pferd und einem erhöhten IgE-Spiegel. WILSON et al. (2001) wiesen IgE-Antikörper gegen *Culicoides*-Speicheldrüsenextrakt nur im Serum von Pferden mit klinischen Symptomen des SE nach, nicht jedoch bei Pferden mit Disposition für das SE, die zum Zeitpunkt der Untersuchung symptomfrei waren. WILSON et al. (2006) ermittelten bei 122 adulten Pferden eine mittlere Gesamt-IgE-Konzentration von 23,523 ng/ml, sowie einen signifikanten Unterschied im Gesamt-IgE-Spiegel zwischen Pferden mit und ohne SE der Rasse Isländer, nicht aber Pferden anderer Rassen mit der gleichen Erkrankung. Dagegen konnten WAGNER et al. (2003) keinen signifikanten Unterschied im Gesamt-IgE-Spiegel im Serum von Islandpferden mit und ohne SE feststellen. Die Varianz dieser Ergebnisse und die Tatsache, dass IgE nur zu einem geringen Teil frei im Serum und zum überwiegenden Teil an seine Effektorzellen gebunden vorliegt und zusätzlich eine kurze Halbwertszeit aufweist, zeigt, dass die Bestimmung des Serum-IgE-Spiegels bis jetzt keine aussagekräftige diagnostische Möglichkeit ist.

#### 2.1.3.2.2 Funktioneller in-vitro Test (FIT)

Ein gezielterer diagnostischer Ansatz ist die Untersuchung der Vorgänge auf der Ebene der für die Typ I-Allergie typischen Effektorzellen (basophile Granulozyten, Mastzellen). Diese Vorgänge sind ein Indikator für die Allergiebereitschaft des Organismus auf bestimmte Allergene. Die isolierten basophilen Granulozyten werden mit einem entsprechenden Allergenextrakt inkubiert. Eine Sensibilisierung durch entsprechende membrangebundene allergenspezifische Antikörper wird über die nachfolgende Freisetzung von Mediatoren (Histamin, Sulphidoleukotriene) qualitativ und quantitativ beurteilt.

KAUL (1998) gelang es nach zahlreichen Untersuchungen zu dem Thema der Histaminfreisetzung aus basophilen Granulozyten (MAGRO et al. 1987; ABDEL-SALAM 1989; DIRSCHERL 1991), einen Allergietest zu schaffen, welcher diese Freisetzung zuverlässig misst und quantifiziert. Der Funktionelle in-vitro Test (FIT) zählt zu den Histamine-Release-Tests (HRT). Diese messen Histamin, welches durch verschiedene Provokationen in gewaschenem Vollblut freigesetzt wird. Histamin ist der einzige Mediator, der nur von basophilen Granulozyten kurzfristig, d.h. während einer einstündigen Inkubation mit Antigenen, freigesetzt wird. Damit ist der FIT in der Lage,

ausschließlich nur die funktionelle Sensibilisierung der Effektorzellen (des Blutes) der Typ I-Allergie zu bestimmen, ohne unspezifische Mediatoren zu messen, die unabhängig von einer allergischen Reaktion von verschiedenen Zellen bei Antigenkontakt bzw. aufgrund der Manipulation der in-vitro Untersuchung freigesetzt werden. Der Test beruht auf dem Prinzip, dass die basophilen Granulozyten mit den vermuteten Allergenen in verschiedenen Konzentrationen in Kontakt gebracht werden. Sind auf der Oberfläche der Zellen genügend sensibilisierende Antikörper gebunden, werden mehrere benachbarte, an Fcε-Rezeptoren gebundene allergenspezifische Antikörper vernetzt und nachfolgend präformierte und neu synthetisierte Mediatoren (Histamin, sLT) freigesetzt. Das freigesetzte Histamin wird in einem RIA (radio immuno assay) quantifiziert und so als Maß für den Grad der Sensibilisierung der basophilen Granulozyten gewertet: Die durch Allergene freigesetzte Histaminmenge wird mit der ins Verhältnis gesetzt, welche durch die physikalische Freisetzung (Zellen werden durch Kochen zerstört) oder durch die eines geeigneten Antikörpers freigesetzt wird (maximale Freisetzung). Die Höhe dieses Verhältnisses entscheidet darüber, ob ein Pferd in Bezug auf das getestete Allergen als sensibilisiert anzusehen ist (KAUL 1998).

Der FIT zählt momentan als Goldstandard der Sommerexzema-Diagnostik in Deutschland und wird von der Tierärztlichen Hochschule in Hannover angeboten. Es werden die Hypersensibilitätsreaktion gegenüber Gnitze (*Culicoides*), Wadenstecher (*Stomoxys*), Kriebelmücke (*Simulium*), Eintagsfliege (*Ephemeridae*), Stechmücke (*Culex*), Pferdebremse (*Tabanidae*), Hausfliege (*Musca Domestica*) und Motte (*Tineoidea*) getestet. Hierbei dienen die Tests der in erster Linie nicht Sommerexzem relevanten Insekten (Motte, Eintagsfliege, Hausfliege) zur Verbesserung der Diagnostik, da sie kreuzreagierende Allergene der hiesigen allergieauslösenden Insekten beinhalten. Sie werden mituntersucht solange keine definierten Allergene verfügbar sind.

#### 2.1.3.2.3 Cellular Antigen Stimulation Test (CAST)

Der von DE WECK et al. (1993) eingeführte Cellular Antigen Stimulation Test (CAST) arbeitet, ebenso wie der FIT, mit gewaschenem Vollblut. Anders als beim FIT jedoch, bei dem selektiv der gespeicherte Basophilenmediator Histamin als Reaktionsparameter dient, wird beim CAST die Freisetzung von Sulphidoleukotrienen gemessen. Vor der eigentlichen Antigenprovokation erfolgt eine Vorstimulation der Zellen mit IL-3. Sulphidoleukotriene sind im Gegensatz zu Histamin, das in

präformierten, intrazellulären Granula gespeichert vorliegt, neu synthetisierte Mediatoren.

Im CAST werden aus dem peripheren Blut eines Probanden isolierte Leukozyten zunächst wie beim HRT mit einem entsprechenden Allergenextrakt inkubiert. Dabei wird jedoch hier ihre Bereitschaft getestet, Entzündungsmediatoren, hier Sulphidoleukotriene, neu zu synthetisieren und freizusetzen. Die von den basophilen Granulozyten gebildeten Leukotriene (LT) C<sub>4</sub> werden schnell zu LTD<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub> metabolisiert und der Gesamtgehalt aller freigesetzten sLT und seiner Metaboliten im Anschluss an die Inkubation mit Hilfe eines ELISA bestimmt. Der CAST wurde als alternativer zellulärer Test zum HRT in den Jahren 1989–1993 entwickelt und ist seit 1993 kommerziell erhältlich (BÜHLMANN Laboratories, Allschwil, Schweiz). Ein großer Vorteil gegenüber den bis dahin verwendeten RIAs und ELISAs mit ihrer hohen Spezifität für nur eine Form der sLT besteht darin, dass der im CAST angewandte monoklonale Antikörper in der Lage ist LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub> mit gleicher Sensitivität und Spezifität zu messen und so entzündliche Aktivitäten in-vitro besser zu erfassen (DE WECK et al. 1993). Weitere Vorteile des Tests liegen in der Tatsache, dass sLT nur von intakten Zellen produziert wird, so dass es nicht zu falsch positiven Ergebnissen durch zytotoxische Aktivitäten kommen kann. Da im Blut von Pferden genügend zirkulierende basophile Granulozyten vorhanden sind, kann der in der Humanmedizin entwickelte Test auch zur Diagnose equiner allergischer Reaktionen herangezogen werden (DE WECK 1993).

VAN ROOYEN und ANDERSON (2004) untersuchten den Einfluss verschiedener Testbedingungen auf die Ergebnisse des CAST und zeigten, dass zahlreiche Veränderungen in der Durchführung des Testes ohne Auswirkungen auf die Ergebnisse blieben. So ergab weder die Verwendung anderer als von BÜHLMANN empfohlener Blutentnahmeröhrchen, die Bearbeitung der Erythrozyten mit 0,83%igem Ammoniumchlorid statt mit Dextran, eine Erhöhung der Leukozytenkonzentration um das Vierfache bzw. Erniedrigung um die Hälfte, noch das Weglassen der Aktivierung der Zellen mit IL-3 eine signifikante Veränderung der Ergebnisse. DE WECK und SANZ (2004) erstellten eine Meta-Analyse mit den Ergebnissen von 37 bestätigten, gut kontrollierten Studien mit insgesamt 1614 Patienten und 1145 Kontrollen und unterstrichen darin den Wert des CAST als diagnostischen Test.

BASELGA et al. (2006) prüften die Eignung des CAST zur Diagnose des überwiegend durch *Culicoides* spp. ausgelösten, IgE-vermittelten SE beim Pferd. Mit Extrakten von *Culicoides nubeculosus* und *Simulium vittatum* untersuchten sie 314 erwachsene

Pferde mit und ohne SE. Bei den Pferden mit SE war die sLT-Freisetzung signifikant höher als bei den Pferden ohne SE. Das Ausmaß der klinischen Symptome sowie das Alter der untersuchten Pferde hatten keinen Einfluss auf die Ergebnisse im CAST. Die höchste diagnostische Sensitivität und Spezifität des Testes lag beim Einsatz von *C. nubeculosus*-Extrakten bei 78 Prozent bzw. 97 Prozent. Einige Pferde reagierten neben den *Culicoides*-Extrakten auch auf die *Simulium*-Präparationen. Insgesamt gesehen hat sich somit der CAST aufgrund seiner hohen Spezifität und guten Sensitivität als brauchbarer Test zur Diagnostizierung allergischer Zustände wie des SEs bei Pferden erwiesen, selbst im Winter bei betroffenen, jedoch symptomfreien Probanden. Die Firma BÜHLMANN Laboratories AG, Allschwil, Schweiz, bietet seit 2005 den speziellen Equine CAST unter Einsatz eines homogenisierten und lyophilisierten Ganzkörperextraktes aus *C. nubeculosus* an. Das Labor für klinische Diagnostik GmbH & Co. KG in Bad Kissingen (LABOKLIN) nutzt seit 2006 den „Equine CAST 2000“ zur Diagnostik von Überempfindlichkeitsreaktionen gegenüber *Culicoides nubeculosus*, *Simulium spp.* sowie *Tabanes* und *Culex*.

Die Korrelation von CAST und klinischer Symptomatik unterscheidet sich je nach Allergieform und Antigen. Die Ergebnisse von Histamin Release Tests und CAST korrelieren relativ gut, während Intrakutantest und CAST eine geringere Korrelation aufweisen ( $r=0,4-0,6$ ) (DE WECK und SANZ 2004). Allerdings ist zu beachten, dass Sulphidoleukotriene außer von Typ I-Effektorzellen auch von anderen Immunzellen des Blutes wie Monozyten, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten freigesetzt werden können, die mit einer Typ I-Allergie wenig zu tun haben. Im Gegensatz dazu stellt Histamin einen für die Effektorzellen der Typ I-Immunreaktionen (Basophile und Mastzellen) spezifischen Mediator dar (TIZARD 2004).

In der Studie von LANGNER et al. (2008) wurden zelluläre und humorale Immunoassays auf ihre Eignung als Bewertungsmethode für das Vorliegen einer Disposition für Sommereczem beim Pferd untersucht. Sie verglichen die Ergebnisse von je neun Pferden mit und ohne Disposition für Sommereczem im HRT, im Intrakutantest und in einem ELISA zum Nachweis *Culicoides*-spezifischer IgE und IgG unter Einsatz eines Ganzkörperextraktes sowie Speichels zweier *Culicoides*-Spezies miteinander. Im Intrakutantest zeigten sich bei der Sofort- (30 min) und Spätreaktion (4 h) signifikante Unterschiede zwischen den Pferden mit und ohne SE. Die genauesten Ergebnisse ermittelten LANGNER et al. mit Hilfe des HRT, der eine Sensitivität von 100 Prozent sowie eine Spezifität von 78 Prozent beim Einsatz des Ganzkörperextraktes bzw. von 100 Prozent unter Verwendung von Speichel der *Culicoides*-Spezies zeigte. Hingegen wiesen verzögerte Reaktionen (24 h) im

Intrakutantest sowie die *Culicoides*-spezifischen Serum-IgE- und IgG-Spiegel kaum oder keine Unterschiede zwischen allergischen und nichtallergischen Pferden auf. Die Ergebnisse LANGNERS et al. weisen darauf hin, dass Allergietests, die auf der Basis von Effektorzellen wie Mastzellen und basophilen Granulozyten funktionieren, besser zu einer genauen Diagnostizierung des SE bei Pferden geeignet sind als serologische Analysen mittels ELISA.

#### 2.1.4 Therapiemöglichkeiten

Eine kausale Therapie des Sommerekzems und damit der Typ I-Allergie existiert bisher nicht.

##### 2.1.4.1 Spezifische Immunotherapie (SIT)

Die Spezifische Immunotherapie (SIT), auch Hypo- oder Desensibilisierung genannt, ist bisher der einzige kausale Therapieansatz für Typ I-Allergien. Hierbei ist das Ziel, die Wirkung von Allergenen in Form einer überschießenden Immunreaktion auf ein betroffenes Individuum zu reduzieren und wenn möglich abzustellen, sodass eine Verringerung oder sogar ein Verschwinden der allergischen Symptome erreicht wird. Das Prinzip dabei ist, dem Patienten zunächst niedrige, im Verlauf der Therapie ansteigende Dosen, welche die natürliche Exposition auch übersteigen, zu applizieren. In der Regel wird eine Langzeit-SIT durchgeführt, da die Dosis des applizierten Allergens aus Sicherheitsgründen nur langsam gesteigert werden darf. Diese erstreckt sich je nach Verlauf der klinischen Symptome über mehrere Jahre. Die Applikation erfolgt überwiegend subkutan, es kann jedoch auch die Verabreichung über die Schleimhäute der Nase oder des Mundes, hierbei besonders sublingual, erfolgen. Die besten Ergebnisse werden durch die Verabreichung hochgereinigter, nur die allergieauslösenden Anteile enthaltender Allergene erzielt (WESTRITSCHNIG et al. 2002; WESTRITSCHNIG und VALENTA 2003), während die Verwendung grober Extrakte eine deutlich niedrigere Heilungsrate bzw. sogar eine Verschlechterung der Symptome mit sich brachte. Die immunologischen Mechanismen, die zur Hyposensibilisierung eines betroffenen Individuums gegenüber einem bestimmten Allergen führen, sind noch nicht endgültig geklärt. Unter anderem konnte unter der SIT ein Anstieg der Zytokine IL-10 und TNF $\beta$  beobachtet werden. Beide Zytokine bewirken eine Anergie der T-Zellen, welche sich auch unter der SIT einstellt. Produziert werden sie von regulatorischen T-Zellen, so dass vermutet wird, dass das Verhältnis von T-Effektorzellen zu regulatorischen T-Zellen eine Rolle bei der Reduzierung der

klinischen Symptome unter der SIT spielt (SCHMIDT-WEBER und BLASER 2004). Ein anderer Erklärungsansatz ist die Bildung protektiver IgG1 -und IgG4-Antikörper unter der SIT. OHASHI et al. (1997) und GEHLHAR et al. (1999) zeigten, dass ein Anstieg dieser beiden Immunglobuline unter der SIT mit einer Verbesserung der klinischen Symptomatik korrelierte. Hier wurde die Bildung von Immunkomplexen aus IgG und Allergenen, die an hemmende Rezeptoren auf den Effektorzellen binden und somit eine Aktivierung der Zellen verhindern, als Ursache für die Verbesserung angesehen. BARBET et al. (1990) untersuchten die Wirkung einer sechsmonatigen Immunotherapie mit einem Ganzkörperextrakt von *Culicoides variipennis* bei sieben Pferden mit SE. Sie ermittelten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Pferden der behandelten Gruppe und den sieben Pferden der Kontrollgruppe. Nur jeweils ein Pferd aus beiden Gruppen zeigte eine Verbesserung der Symptome. Hingegen konnten ANDERSON et al. (1996) bei 10 Pferden mit SE nach Immunotherapie mit einem Ganzkörperextrakt aus *Culicoides* spp. bei neun der 10 Pferde nach einem Jahr eine Reduzierung der Symptome feststellen. Nach zweijähriger Therapie waren drei Tiere frei von klinischen Symptomen, drei Pferde zeigten eine deutliche, zwei eine geringe Reduzierung der klinischen Symptomatik. Zur Behandlung des SE des Pferdes mittels SIT stehen bisher nur Ganzkörperextrakte von Mücken zur Verfügung. Daraus resultieren einerseits begrenzte Therapieerfolge, andererseits besteht die Gefahr der Allergisierung des Patienten gegenüber bisher noch nicht allergisierenden Bestandteilen des Extraktes. Bisher ist es noch nicht endgültig gelungen, das oder die Protein(e) zu identifizieren, welche die allergischen Reaktionen auslösen. Wahrscheinlich handelt es sich um Proteine aus dem Speichel der *Culicoides* spp. in dem gleich mehrere potenzielle Allergene vorliegen (WILSON et al. 2001; FERROGLIO et al. 2006; HELLBERG et al. 2006). In neueren Untersuchungen von WILSON et al. (2008) und LANGNER et al. (2009) gelang es den Autoren mittels Massenspektrometrie, die Maltase, ein zur Abspaltung von Glukose benötigtes Enzym, zu isolieren. LANGNER et al. (2009) setzten eine rekombinante Maltase (rCul s 1) im Immunoblot, HRT und Intrakutantest an Pferden mit und ohne SE ein und folgerten aus den Ergebnissen, dass rCul s 1 als erstes identifiziertes Allergen aus dem Speichel von *C. sonorensis* gelten kann. Die Ergebnisse dieser Studien könnten einen wesentlichen Beitrag zur Entwicklung der Immunotherapie für das SE beim Pferd leisten.

#### 2.1.4.2 Andere Therapiemöglichkeiten

Erfolgreiche therapeutische Ansätze beschränkten sich bislang auf die symptomatische Behandlung des Ekzems durch die Gabe von entzündungshemmenden

Corticosteroiden, die jedoch aufgrund massiver Nebenwirkungen (Hufrehe, erhöhte Anfälligkeit für Infektionskrankheiten verschiedenster Genesen u. a.) nicht für eine Langzeittherapie geeignet sind (FREY und LOESCHER 2001).

Einen weiteren Überblick über die von Tierärzten und Patientenbesitzern verwendeten (symptomatischen) Therapeutika gibt RÜSBÜLDT (2001). So werden neben der äußerlichen Anwendung verschiedenster Fette, Öle und Insektenrepellentien, u. a. Corticoide oder Antihistaminika eingesetzt, aber auch Homöopathika, Eigenblutbehandlungen und ihre Variationen, Bioresonanz oder biologisch aktive Peptide.

BRÜNNLEIN (2001) konnte in ihren Untersuchungen zum Sommerexzem keinen dauerhaften und zuverlässigen Einfluss der weit verbreiteten Therapien mit Ökozon, Allergostop® I (Gegensensibilisierung nach Theurer) oder Insol® Dermatophyton auf die generelle oder *Culicoides*-spezifische Sensibilisierung nachweisen.

Erfolgversprechend bleibt bisher alleine eine möglichst weitreichende Allergenkenz (Ekzemerdecken, Verbringen der Tiere in mückenfreie bzw. -arme Umgebung, Aufstallen zur Hauptflugzeit der Mücken) (BARNARD 1997; RÜSBÜLDT 2001). Allerdings bedeutet auch dies keine Heilung der Allergie, sondern nur ein Verhindern der klinischen Symptome. Selbst nach bis zu 15 Jahren Symptommfreiheit, erreicht durch Verbringen von sommerexzemkranken Tieren auf die Nordseeinsel Spiekeroog, - Gnitzen sind auf den ostfriesischen Inseln auf Grund der ganzjährigen Westwinddrift nicht endemisch - blieb die spezifische Sensibilisierung deutlich bestehen (KOBELT 2001). Auch nach dieser langen Zeit hätte also ein erneuter Allergenkontakt den klinischen Ausbruch des Sommerexzems zur Folge.

#### 2.1.4.2.1 Homöopathika und Eigenbluttherapie

Bei der Anwendung von Homöopathika wird, auch beim Einsatzgebiet der allergischen Erkrankungen, die umstimmende Wirkung auf das Immunsystem genutzt. Bei der Eigenbluttherapie steht der Gedanke im Vordergrund, dass bei jeder Krankheit natürliche Heilungsvorgänge unabdingbar sind und durch gezielte „Reiztherapie“ Heilungsprozesse beschleunigt werden können (KREBS 1999). Ein solcher Reiz wird durch das bei der Eigenbluttherapie injizierte Blut gesetzt und hierdurch eine Veränderung der Reaktionslage im Organismus ausgelöst. Nach außen sichtbar wird dies durch eine verstärkte Bildung histiozytärer Zellen. So stieg die Anzahl der Monozyten im Anschluss an eine Injektion von 40 ml Eigenblut von fünf auf 22 Prozent

an. Es wird eine Stimulierung der unspezifischen wie auch der spezifischen Abwehr bewirkt (KREBS 1999). Gerne werden diese beiden Therapieansätze in Kombination eingesetzt und zeigen positive Effekte bei der Therapie von akuten und chronischen allergischen Erkrankungen.

So berichtete DORENKAMP (1997) über gute Behandlungserfolge mit Traumeel® ad us. vet. vermischt mit Eigenblut und zusätzlicher Gabe von Carduus und Coenzyme compositum beim Sommerkzem des Pferdes. Ebenso zeigten STEIDLE und ENBERGS (2003), dass die Leitsymptome des SE - Juckreiz und Hautveränderungen – durch die Therapie mit Traumeel® ad us. vet. in Kombination mit Eigenblut sowie zusätzlicher Gabe von Carduus und Coenzyme compositum signifikant reduziert werden konnten. Ebenfalls positiv wirkte sich die prophylaktische Behandlung von sommerkzemkranken Tieren mit Engystol® ad us. vet. in Kombination mit Eigenblut, Carduus, Coenzyme compositum und Traumeel® ad us. vet. aus (STEIDLE 2009). Dieses ist in der Lage, die Immunantwort weg von der für allergische Reaktionen typischen Th2-Zell-Antwort hin zur Th1-Immunantwort zu modulieren (ENBERGS und VERDROSS 2005). Zwar konnte der Ausbruch des Sommerkzems nicht verhindert werden, allerdings zeigten die behandelten Pferde deutlich weniger Juckreiz.

#### 2.1.4.2.2 Insol® Dermatophyton

Insol® Dermatophyton (ID) ist ein seit 1999 zur therapeutischen und prophylaktischen Immunisierung von Pferden, Hunden und Katzen zugelassener Totimpfstoff gegen Dermatophytosen. Der polyvalente Impfstoff enthält inaktivierte Mikronkoniden von acht verschiedenen Dermatophyten-Stämmen (*Trichophyton equinum*, *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton sarkisovii*, *Microsporum canis var. distortum*, *Microsporum canis var. obesum*, *Microsporum gypseum*) und deckt damit alle klinisch relevanten Hautpilzerreger bei den zugelassenen Tierarten ab (FENNER 2009). Beim Pferd sind *Trichophyton equinum* mit ca. 65% und *Microsporum canis/equinum* mit ca. 25% in Deutschland am häufigsten anzutreffen (GERBER 1994; SLOET 2008).

Insol® Dermatophyton ist für Pferde ab einem Alter von fünf Monaten geeignet, sollte jedoch nicht bei tragenden Stuten und Tieren mit Fieber/Anzeichen einer anderen Infektionskrankheit als Dermatophytose angewandt werden.

Die Dosierung zur Therapie und Prophylaxe von Dermatophytosen beträgt bei Pferden unter 400 kg 0,3 ml ID und bei Pferden über 400 kg Körpermasse 0,5 ml. Die Impfung

erfolgt zweimal (im Einzelfall auch dreimal) im Abstand von 14 Tagen und muss tief intramuskulär, am besten in die entspannte Muskulatur, und an wechselnden Stellen/Körperseiten erfolgen.

Der Impfschutz besteht ab ca. fünf Wochen nach der ersten Impfung und hält mindestens neun Monate.

Da keine Informationen zur Sicherheit und Wirksamkeit bei gleichzeitiger Verabreichung anderer Impfstoffe vorliegen, wird empfohlen innerhalb eines Zeitraums von 14 Tagen vor und nach der Behandlung mit ID keine andere Impfung durchzuführen.

Nach der Impfung sind die Pferde, wie nach jeder Impfung, für 48 h zu schonen. Als Nebenwirkungen zeigen sich bei ca. drei Prozent der Pferde lokal begrenzte leicht schmerzhaftige Schwellungen (bis max. vier cm Durchmesser) an der Injektionsstelle, in seltenen Fällen größere (bis ca. 15 cm). Bei ca. 1,3% der geimpften Tiere treten systemische Nebenwirkungen in Form von Fieber, Apathie und Appetitverlust auf. Sowohl lokale als auch systemische Nebenwirkungen verschwinden in den meisten Fällen innerhalb von ca. acht Tagen von allein ohne weitere Behandlung (BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA).

Empirische Studien und Erfahrungswerte praktizierender Tierärzte gehen von einer therapeutischen und prophylaktischen Wirksamkeit von Insol® Dermatophyton beim Sommerexzem aus. So beschrieb GREMMES (2002) in einer retrospektiven Auswertung eines Patientenpools von 52 an Sommerexzem erkrankten Pferden eine Besserung bei 70 Prozent der Großpferde, 50 Prozent der Isländer und 30 Prozent der Ponys nach zweimaliger doppelter ID Injektion als „Grundimmunisierung“ im Februar oder März vor der Weidesaison. Die niedrigere Erfolgsquote bei den Isländern und Ponys wird durch den hier vorliegenden höheren Anteil an „Altekzemern“ erklärt. Als Impfschema gibt er eine mindestens zweimalige Impfung im Abstand von je zwei Wochen mit der doppelten Dosis ID (bis max. 2ml) in der insektenfreien Zeit zu Beginn des Jahres (Februar bis Ende März) an. Je nach Bedarf kann noch eine Wiederholungsimpfung (Booster) Mitte des Sommers (August) durchgeführt werden (GREMMES in PFERDE SPIEGEL 2002).

DRONOV und ROHWER (2007) testeten den möglichen immunmodulatorischen Einfluss von Insol® Dermatophyton auf equine Leukozyten in-vitro. Dazu wurden hochreine equine Leukozyten aus dem Blut von Pferden mit und ohne Sommerexzem isoliert, kontrolliert kokultiviert und unter drei Gesichtspunkten untersucht:

1. Einfluss von ID auf die Vitalität und das Proliferationsverhalten equiner mononucleärer Zellen (eqMNC) während 72 stündiger in-vitro Kultur mit und ohne Stimulation durch Phythämagglutinen.

Hier zeigte sich eine modulierende Wirkung des ID in seinen beiden höchsten Konzentrationen.

2. Überprüfung des Einflusses von ID auf die Vitalität und das Proliferationsverhalten eqiner MNC während 36 stündiger in-vitro Kultur mit und ohne Stimulation durch Staphylokokken Enterotoxin A (SEA) in Anwesenheit von gleicher Anzahl autologer neutrophiler Granulozyten.

In Kokulturen von MNC und neutrophilen Granulozyten (PMN) konnte für keine Konzentration des ID ein Einfluss auf die MNC festgestellt werden.

3. Einfluss von ID auf die Expression ausgewählter Zytokine (IL-4, IL-10, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) von equinen MNC.

Hier zeigte sich eine deutliche Wirkung des ID. IL-4 wurde kaum, dafür jedoch IL-10 produziert. Ebenso induzierte ID in beachtlichem Maße die Transkription von IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  exakt in dem Bereich, in dem auch eine funktionelle Modulation bei eqMNC nachweisbar war.

Durch die vermehrte Expression des Th1-Leitzytokins IFN $\gamma$  wird die Reaktionslage des Organismus von Allergie (Th2, Leitzytokin IL-4) zu mehr Toleranz (Th1) verschoben. Ebenso spricht die verstärkte Induktion von TNF $\alpha$  mit seiner aktivierenden Wirkung auf Monozyten für eine Immunmodulation durch ID.

## 2.2 Allergief Formen

Allergien werden im Allgemeinen in vier Typen eingeteilt, wobei grob Antikörper vermittelte (Typen I bis III) von Antikörper unabhängigen Immunreaktionen (Typ IV) unterschieden werden (GELL und COOMBS 1968). Eine Typ V-Allergie, deren Antikörper abhängiger Mechanismus sich wesentlich von den Typen I – III unterscheidet, hat bisher noch keinen breiten Eingang ins Schrifttum gefunden (LEIBOLD 2006).

Diese Einteilung wurde aufgrund von Forschungsergebnissen aus der Humanmedizin und dem murinen System vorgenommen und in die Veterinärmedizin übernommen. Bis

heute ist nicht vollständig geklärt, ob sich die entsprechenden Mechanismen in gleicher Ausprägung auf andere Spezies übertragen lassen (JANEWAY 2005).

Alle diese Immunreaktionstypen fassen lebensnotwendige Mechanismen zusammen, die bei überschießender Reaktion auch als „Allergiemechanismen“ bezeichnet werden.

Als Typ I-Allergien bezeichnet man die Allergien vom Soforttyp. Hierbei treten die klinischen Symptome in der Regel sehr schnell, meist innerhalb von Minuten (selten Stunden), nach dem Allergenkontakt auf. Diesem Mechanismus können protektive, regulatorische aber auch überschießende immunologische Reaktionen zugeordnet werden (COSTA et al. 1997).

Im Rahmen der immunologischen Antwort eines Individuums gegen ein Antigen synthetisieren B-Zellen unter Einfluss von Th2-Zellen und deren Signalmolekülen, den Interleukinen, allergenspezifisches IgE. Dieses IgE wird, im Gegensatz zu anderen Immunglobulinen, schon in unkomplexierter Form über den hochaffinen Fcε-Rezeptor I (FcεRI) auf der Oberfläche von v.a. Mastzellen und basophilen Granulozyten gebunden. Diese zwei Zelltypen exprimieren diesen Rezeptor konstitutiv, während er auf einigen anderen Zellen induziert werden kann (FROESE 1984).

Freies Serum-IgE hat eine Halbwertszeit von wenigen Stunden bis Tagen. Ungebunden liegt IgE im Vergleich zu anderen Immunglobulin-Isotypen in sehr geringen Konzentrationen im Serum vor. Allerdings ergeben sich hier tierartige Unterschiede in stärkerem Maße, als bisher vermutet (WAGNER et al. 2002). Ein wesentlicher Grund für den niedrigen IgE-Spiegel ist die Bindung an FcεRI, denn frei verfügbares IgE steigert die Expression dieses Rezeptors (FURUICHI et al. 1985; KUBO et al. 2001). Durch die Expression neuer Rezeptoren für IgE wird der Serumspiegel an IgE gesenkt. Dieser autokrine Verstärkungsmechanismus der FcεRI Expression ist initial nur vom Isotyp, also dem IgE abhängig. Eine fortgesetzte Präsenz des Antigens (Allergens) kann aber eine positive Rückkopplung des Typ I-Immunmechanismus bewirken, indem allergenspezifische B-Zellen aktiviert werden. Die notwendigen Zytokine werden von basophilen Granulozyten und/oder Mastzellen selbst zur Verfügung gestellt (GAUCHAT et al. 1993; YANAGIHARA et al. 1998). Als Folge dominieren jene IgE-Isotypen den Serumpool, deren B-Zellen wiederholt oder dauerhaft aktiviert werden. Kommt es im Weiteren zu einem erneuten Kontakt des Individuums mit dem Allergen, so führt dessen Bindung an die spezifischen zellständigen IgE-Moleküle der sensibilisierten Mastzellen oder basophilen Granulozyten zu einer Kreuzvernetzung dieser Immunglobuline, sofern sie auf der Zelloberfläche in ausreichender Dichte vorhanden sind. Die so herbeigeführte

Zusammenlagerung der Fcε-Rezeptoren aktiviert die Zelle, die zum einen innerhalb von Sekunden mit Degranulation präformierter Entzündungsmediatoren (u.a. Histamin, Proteoglykane, Proteasen) aus zytoplasmatischen Granula reagiert (Sofortreaktion). Zum anderen werden Arachidonsäuremetaboliten, wie bestimmte Leukotriene (Lipoxygenasemetaboliten, v.a. LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>) und Prostaglandine (Cyclooxygenasemetaboliten, v.a. PGD<sub>2</sub>), aber auch Zytokine (u.a. IL-4, TNFα) neu synthetisiert und ausgeschüttet. Diese erhalten die Entzündungsreaktion über Stunden aufrecht (Spätreaktion).

Im gesunden Individuum besiedeln die Mastzellen die Lamina propria der Schleimhäute sowie das Korium der Haut. Sowohl die basophilen Granulozyten, als auch die Mastzellen entstehen im Knochenmark. Während ihres Aufenthaltes im peripheren Blut beladen sich die Zellen mit monomerem IgE und verlassen derart sensibilisiert die Blutbahn. Dementsprechend werden die Fcε-Rezeptoren mit einem zum Zeitpunkt der Beladung repräsentativen Querschnitt aller aktuellen IgE - Idiotypen im Serum ausgestattet. Im Gewebe können diese Zellen dann bei erneutem Kontakt zu einem Antigen, gegen das sie spezifische Immunglobuline gebunden haben, degranulieren. Somit stellen Mastzellen einen wesentlichen Anteil der „*first line of defense*“ dar. Durch die freigesetzten Mediatoren wird im Gewebe eine lokale Begrenzung der Antigenverteilung bewirkt, indem sich der Blutfluss im irritierten Bereich verlangsamt und die Exsudation von Plasma sich erhöht. Es kommt zur Ödembildung. Im Folgenden werden weitere Leukozyten chemotaktisch angelockt. Es etabliert sich eine Entzündung. Seine physiologische Bedeutung hat dieser Mechanismus v.a. im Zuge der Immunantwort auf parasitäre Infektionen (Helminthen). Er ist aber auch bei der Abwehr anderer Pathogene, inklusive bakterieller, beteiligt. Kommt es zur Ausprägung pathologischer Hypersensibilitätsreaktionen unter diesem Mechanismus können diese lokal beschränkt, aber auch systemisch ablaufen. Typ I-Allergien des Menschen sind u.a. die allergische Rhinitis (Heuschnupfen), das Asthma, aber auch die systemische Anaphylaxie bis hin zum allergischen Schock.

Bei Typ II-Allergien handelt es sich um Immunmechanismen, welche durch Antikörper vom IgG- und IgM-Isotyp vermittelt werden. Auf der Oberfläche partikulärer Antigene gebundenes IgG (Antigen-Antikörper-Komplex) kann Phagozyten über deren Fcγ – Rezeptoren (FcγR) dazu aktivieren, diese opsonisierten Antigene per Phagozytose zu eliminieren. Auf Zelloberflächen gebundenes IgG kann von NK (natürliche Killer)-Zellen, die den FcγRIII exprimieren, erkannt werden, woraufhin diese die antikörpermarkierten Zielzellen zytotoxisch zerstören (antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC)). Ein dritter IgG-vermittelter Mechanismus ist die Aktivierung des

klassischen Weges der Komplementkaskade über die Bindung von antigengebundenem IgG, und noch effektiver IgM, an C1q, einem von drei Proteinen im C1-Komplex. Die Aktivierung von C1q durch IgG erfordert jedoch eine ausreichend hohe Epitop- und Immunglobulindichte auf dem Pathogen, da dieser Komplementfaktor hierzu an mindestens zwei aktivierten Fc-Teilen komplementbindender Immunglobulinmoleküle binden muss. Im Rahmen dieser Allergie sind die Antikörper gegen zellassozierte Antigene gerichtet und lösen entweder über Phagozyten und NK-Zellen oder über das Komplementsystem die charakteristischen Effektormechanismen aus. Beispiele aus der Humanmedizin hierfür sind die Überempfindlichkeitsreaktionen gegen Penicillin, Methyldopa oder Chinidin. Diese Medikamente binden auf der Zelloberfläche von Erythrozyten oder Thrombozyten. Existieren spezifische Antikörper, die diese Medikamente erkennen, binden sie sich an diese und lösen eine Komplementaktivierung aus, die zur Entfernung der betroffenen Blutzellen und somit zur immunhämolytischen Anämie bzw. Thrombozytopenie führt. Antikörper können ebenso gegen körpereigene Zell- oder Matrixantigene gebildet werden und sind unter dem Typ II-Mechanismus so die Ursache für Autoimmunerkrankungen, wie die autoimmune hämolytische Anämie, thrombozytopenische Purpura, Goodpasture-Syndrom, oder Pemphigus vulgaris.

Auch bei der Typ III-Allergie sind Antikörper beteiligt. Im Gegensatz zu Typ II sind die Antikörper jedoch gegen lösliche Antigene gerichtet, mit denen primär lösliche Immunkomplexe gebildet werden. Die im Verlauf der physiologischen Immunreaktion gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe aktivieren, wenn komplementbindende Isotypen beteiligt sind, das Komplementsystem (klassischer Weg). Sie werden mit dessen Hilfe über den Komplementfaktor C3b an Erythrozyten angelagert (Komplementrezeptor 1 (CR1)) und zur Milz und Leber transportiert, wo sie von Makrophagen phagozytiert werden.

Bei der Typ III-Allergie entstehen durch Antigenüberschuss relativ kleine Aggregate von Antigen-Antikörper-Komplexen. Dadurch wird das Komplementsystem schlechter aktiviert (aufgrund fehlender komplementbindender Antikörperisotypen). Aufgrund dessen werden diese Immunkomplexe schlechter oder gar nicht an Erythrozyten gebunden, da diese zwar den Komplementrezeptor CR1, jedoch keine Fc-Rezeptoren haben. Dies führt zu einem verminderten Abbau kleiner Immunkomplexe. Diese freien Komplexe neigen dazu, sich an den Basalmembranen kleiner Gefäße abzulagern. Mastzellen können solche Komplexe binden (über FcγRIII) und dadurch aktiviert werden. Die TNFα-Freisetzung durch so aktivierte Mastzellen gilt als Hauptursache für die nachfolgenden Entzündungsreaktionen (WATANABE et al. 1999; BAUMANN et al.

2001), da hierdurch Leukozyten in das Entzündungsgebiet gelockt werden. Über eine Verknüpfung von Fc-Rezeptoren und Komplementrezeptoren auf Leukozyten werden diese aktiviert und lösen im Folgenden eine Schädigung des umliegenden Gewebes aus. Ein klassisches Beispiel für die Typ III-Allergie ist die so genannte „Serumkrankheit“, die heute noch bei der Anti-Venin-Behandlung eine Rolle spielt. Serum von Pferden, die zuvor mit Schlangengift immunisiert wurden, dient dabei als Quelle für neutralisierende Antikörper bei der Behandlung von Schlangenbissen beim Menschen. Injizierte Bestandteile, insbesondere die Antikörper aus dem Pferdeserum, lösen eine adaptive Immunantwort des Empfängers mit Bildung anti-equiner Antikörper aus, die bei wiederholter Applikation eines solchen Serums zur Immunkomplexbildung mit den zirkulierenden Antigenen führt. Diese massive Bildung von Immunkomplexen führt zu deren Ablagerung in Gefäßen, Nieren und Gelenken und somit zu autoaggressiven Vasculitiden, Glomerulonephritis und Arthritiden. Auch Autoimmunerkrankungen können nach diesem Mechanismus ablaufen, z.B. bei der gemischten essentiellen Kryoglobulinämie (Antikörper gegen körpereigene Immunglobuline) oder dem systemischen Lupus erythematoses mit Bildung von ANA's (Anti Nukleäre Antikörper: Antikörper gegen u.a. körpereigene Zellkernbestandteile wie DNS, Histonen oder anderen Nukleoproteinen).

Letztlich besteht noch die Möglichkeit, dass Antikörper, ohne Beteiligung von Fc-vermittelten Sekundärreaktionen, allein durch ihre spezifische Bindung zur Erkrankung führen (Typ V-Reaktionen). Unter physiologischen Umständen erfüllen Antikörper neben ihrer vermittelnden Rolle im Rahmen der Opsonisierung und Komplementaktivierung auch ohne Beteiligung weiterer Faktoren bestimmte Funktionen. So sind sie wichtig zur Neutralisation z.B. von Toxinen oder beeinflussen über ihre Bindung an zellständige Rezeptoren z.B. die Produktion von weiteren Antikörpern. Bei einer Typ V-Allergie können die im Rahmen von Infektionen gebildeten Antikörper mit körpereigenen Strukturen, z.B. Rezeptoren kreuzreagieren und diese z.B. stimulieren (TSH-Rezeptoren bei Basedow-Krankheit) oder blockieren (Acetylcholinrezeptoren bei Myasthenia gravis).

Auch in der zellvermittelten Immunantwort (Typ IV-Allergie) kann es, ohne Beteiligung von Immunglobulinen, zu Störungen im Sinne von Allergie oder Autoaggression kommen. Wird ein Antigen von den antigenpräsentierenden Zellen hierbei über MHC-Klasse II an der Zelloberfläche gezeigt, werden dadurch CD-4-T-Zellen (T-Helferzellen) angesprochen. Pathogen- und milieuabhängig können sich die CD-4-Zellen daraufhin in mindestens zwei Richtungen, Th1 oder Th2, differenzieren und im Weiteren anhand der Sekretion charakteristischer Zytokine und Chemokine z.B. Makrophagen aktivieren

und B-Zellen zur IgG-Produktion anregen (Th1) oder z.B. durch Einfluss auf die Differenzierung antigenaktivierter B-Zellen eine v.a. antikörpervermittelte Immunantwort auslösen (Th2). Im Verlauf von Überempfindlichkeitsreaktionen vom Typ IV erfolgt die Differenzierung der T-Helferzellen zu Th1-Zellen, bei Typ I-Allergien zu Th2. Altbekanntes Beispiel einer T-Zell vermittelten Allergie ist die Tuberkulinreaktion, aber auch Kontaktallergien, z.B. auf Pentadecacatechol, einer Substanz aus den Blättern des Gift-Sumach, oder Metallionen, wie Nickel und Chrom, fallen unter diese Kategorie. Eine Autoimmunerkrankung, die diesem Mechanismus folgt, ist z.B. die gegen das basische Myelinprotein (MBP) gerichtete autoaggressive Reaktion, die zur multiplen Sklerose führt. Wird ein Antigen über MHC-Klasse I präsentiert, reagieren darauf CD-8-Zellen und differenzieren unter dem regulierenden Einfluss von T-Helferzellen zu zytotoxischen T-Zellen aus. Diese töten zum einen diese antigenpräsentierenden Zellen ab, können aber auch Zytokine sezernieren, die u.a. Makrophagen anlocken und aktivieren (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ ). Lipidlösliche Allergene, wie Pentadecacatechol können über diesen Weg eine Gewebsschädigung verursachen, da sie die Zellmembran durchqueren können und Proteine im Zellinneren verändern. Als Peptide gelangen diese dann über das endoplasmatische Reticulum und MHC-Klasse I-Moleküle an die Zelloberfläche, wo sie von CD-8-Zellen erkannt werden (JANEWAY 2002).

### 2.3 Immunmodulation

Das Konzept der Immunstimulation wurde bereits 1907 von Dr. William B. Coley erstellt. Dieser bemerkte bei einigen seiner Patienten eine spontane Tumorregression nach Septikämie. Aufgrund dieser Beobachtung entwickelte er ein Gemisch von Bakterientoxinen (Coley's Toxin), welches er zur Krebstherapie einsetzte (RUSH 2001).

ROLLE und MAYER (1993) führten den Begriff der „Paramunisierung“ ein, womit sie zunächst Antigen unspezifische, begleitende Wirkungen von Schutzimpfungen bezeichneten. Deren funktionelle Mechanismen ordneten sie fast durchweg den angeborenen Immunmechanismen (Phagozytose, ADCC, Bildung von Interferon, Aktivierung des Komplementsystems, hormonelle Interaktionen) zu. Die „Paramunisierung“ sei allerdings auf die „noch vorhandene Funktionsfähigkeit des Immunsystems und seiner Zellen angewiesen“. Durch die Paramunität soll ein schnell einsetzender (wenige Stunden), aber nur kurz anhaltender (einige Tage) Schutz des Individuums erreicht werden; ein Boostereffekt soll nicht zustande kommen.

TIZARD (1993) definierte Immunstimulantien durch ihre Fähigkeit, nicht antigenspezifische humorale und auch zellvermittelte Abwehrmechanismen zu fördern. Dies wird seiner Ansicht nach durch Makrophagen vermittelt, die durch die Phagozytose der Immunstimulanspartikel aktiviert werden und daraufhin bestimmte Zytokine (INF, IL-1, TNF und/oder IL-6) freisetzen und so zu einer Steigerung der Phagozytoseaktivität, der Antikörperproduktion und der Zytotoxizität führen.

RUSH (2001) untersuchte in seiner Studie die klinische Anwendung von immunstimulierenden Substanzen und stellte die Behauptung auf, dass immunstimulatorische Therapien v.a. bei chronischen oder rezidivierenden Infektionen wirken, da hier eine Immunsuppression oder -toleranz vorläge. Für wenig sinnvoll hält er ihren Einsatz bei akuten Infektionen, da dort das Immunsystem bereits maximal stimuliert sei.

### 2.3.1 Immunmodulation der Typ I-Allergie

#### 2.3.1.1 *Modulation der Th1- / Th2-Balance*

Bei Therapieversuchen von IgE vermittelten Typ I-Allergien mittels Immunmodulation stellt das Hauptangriffsziel die Th1-/Th2-Balance dar. Dies stützt sich auf die weithin anerkannte Hypothese, dass die Bildung von Antikörpern des Isotyps IgE durch B-Zellen eine Folge der Dominanz von Th2-Helferzellen und der von diesen Zellen ausgeschütteten Zytokine (IL-4, IL-13) zum Zeitpunkt der Antigenerkennung darstellt.

MOSMANN et al. (1986) beschrieben bei der Maus zwei verschiedene T-Helferzell-Klone, die sie anhand ihrer Zytokinsekretionsmuster unterscheiden. Zum einen Th1-Zellen mit den von ihnen gebildeten Zytokinen IFN $\gamma$ , IL-2 und TNF $\beta$ , zum anderen Th2-Zellen mit IL-4 und IL-5. Diese entwickeln sich aus naiven T-Helferzellen (Th0-Zellen). Entscheidend, ob sich die naiven T-Helferzellen zu Th1- oder Th2-Zellen differenzieren, ist das zum Zeitpunkt der Antigenpräsentation herrschende Zytokinmilieu. Dabei wird IL-4 eine entscheidende Rolle für die Differenzierung hin zu Th2-Zellen zugeschrieben. Aber auch andere Zytokine (IL-1, IL-6 und IL-13) begünstigen die Th2-Entwicklung. Zudem ist IL-4 in der Lage, die Expression von IL-12-Rezeptoren auf antigenaktivierten T-Helferzellen zu unterdrücken. Dies ist deshalb von Bedeutung, da IL-12 die Entstehung des Th1-Phänotyps fördert. Eine weitere wichtige Rolle in der Regulation spielt IFN $\gamma$ , das über einen auf Th2-Zellen, nicht aber auf Th1-Zellen, exprimierten Rezeptor binden kann, welcher antiproliferative Signale auf die Th2-Zelle überträgt und so die Differenzierung hin zu Th1-Zellen unterstützt

(HAAS et al. 1999). Ebenso ist eine Beeinflussung der Th1- / Th2-Balance durch Chemokine, einer Unterfamilie der Zytokine, möglich (HAYGLASS et al. 2000). Chemokine sind eine Gruppe kleiner Proteine, die sich durch stark konservierte strukturelle Motive, basierend auf einem Cystein-Gerüst, auszeichnen. Diese Chemokine (chemotactic cytokines) und ihre Rezeptoren spielen unter anderem eine Schlüsselrolle bei der Leukozytenmigration. Das Chemokin Eotaxin, welches von Epithelzellen und Phagozyten gebildet wird, wirkt zum Beispiel sehr selektiv auf basophile und eosinophile Granulozyten. Zudem besteht der Verdacht, dass Chemokine eine differenzierte Rekrutierung von Th1- oder Th2-Zellen in ein Entzündungsgebiet bewirken können (z.B. konnte bei Th2-Zellen die Expression des Eotaxin-Rezeptors nachgewiesen werden) (HAYGLASS et al. 2000). Neben ihrer chemotaktischen Fähigkeit wird den Chemokinen zusätzlich eine Beteiligung bei weiteren immunologischen Funktionen zugeschrieben, wie z.B. der Hemmung der T-Zell-Proliferation, der Aktivität zytotoxischer T- und NK-Zellen und der Förderung eines Th1-Zytokinmilieus und einer Th1-Immunantwort. So exprimieren Th1- und Th2-Zellen z.T. verschiedene Chemokinrezeptoren auf ihren Oberflächen, oder aber bestimmte Rezeptoren in unterschiedlicher Dichte. Weitere Untersuchungen lassen vermuten, dass auch die initiale Differenzierung der naiven T-Zellen durch Chemokine mitgesteuert wird. Die Effekte von Chemokinen scheinen außerdem nicht nur auf T-Zell-Funktionen beschränkt zu sein. Bei atopischen Patienten konnte z.B. eine direkte Stimulation von B-Zellen durch Chemokine zur IgE- und IgG4-Synthese nachgewiesen werden. (SIEVEKE und HAMANN 1998; HAYGLASS et al. 2000; CHENG et al. 2001).

Das Zytokin-/ Chemokinmilieu unterliegt einer komplexen Regelung durch eine Vielzahl endogener und exogener Faktoren. Dabei sind u.a. auch die Art des Pathogens, die Antigenmenge, die physikalische Form und die Eintrittspforte des Antigens von Bedeutung. Bakterien-, Protozoen- und Virenantigene scheinen über ein Triggering von Makrophagen und dendritischen Zellen bevorzugt zur IL-12 Freisetzung und somit zur Th1-dominierenden Immunantwort zu führen, wohingegen Wurmparasiten und als Allergene fungierende Antigene über IL-4 und IL-13 aus basophilen Granulozyten favorisiert eine Th2-Antwort induzieren (HAAS et al. 1999). Auch Speichelextrakt der Zecke *Ixodes ricinus* soll eine Th2-dominante Immunantwort auslösen (KOVAR et al. 2001). Es kann somit die Hypothese aufgestellt werden, dass auch Speichel von anderen blutsaugenden Insekten, insbesondere *Culicoides*, ebenfalls diese Reaktion auszulösen vermag, was für die Ätiologie des Sommererkzems von Bedeutung wäre. Ein Ziel der Immunmodulation im Zuge der Allergie vom Typ I ist nun eine Umlenkung

von einer Th2- zu einer Th1-gerichteten Immunantwort und somit weg von einer IgE-vermittelten zu einer Zell-, bzw. IgG-vermittelten Reaktion. Die hierzu verwendeten Immunmodulatoren werden wie folgt eingeteilt: Th1-fördernde Zytokine (z.B. IFN $\gamma$ ), Immunsuppressoren oder Inhibitoren der Zytokintranskription (z.B. Cyclosporin A, Tacrolimus) und Th2-Zell-Inhibitoren (z.B. Suplatast). Weitere, nicht etablierte, Therapien basieren auf monoklonalen Antikörpern gegen T-Zellen oder gegen Zytokine oder auf Zytokinrezeptor-Antagonisten (TOKURA et al. 2001). Neuere Untersuchungen beschäftigen sich mit der Möglichkeit einer Th1-Induktion durch abgetötete Bakterien oder deren Bestandteile, CpG Oligodesoxynucleotiden oder Plasmid-DNS (WOHLLEBEN und ERB 2001). CpG-DNS soll über die Aktivierung von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen die Bildung Th1-artiger Zytokine (z.B. IL-12) stimulieren und über die Aktivierung von NK-Zellen die Freisetzung des Th2-hemmenden IFN $\gamma$  fördern (KRIEG 1999).

### 2.3.1.2 Modulation von Effektorzellen

Ist der Klassenwechsel unter Einfluss von Th2-Zellen erfolgt und produzieren B-Zellen nun IgE-Antikörper, werden diese über den hochaffinen Fc $\epsilon$ -Rezeptor I (Fc $\epsilon$ -RI) v.a. an der Oberfläche von Mastzellen und basophilen Granulozyten gebunden. Binden spezifische Antigene bzw. Allergene an zellständige IgE-Moleküle, können sie diese, wenn in ausreichender Menge vorhanden, kreuzvernetzen und die Fc $\epsilon$ -Rezeptoren somit zusammenlagern, was zur Aktivierung der Zelle führt. Versuche, die Rezeptoren durch IgE-Analoga oder Anti-Fc $\epsilon$ -RI-Antikörper kompetitiv zu hemmen, führten i.d.R. zur Aktivierung und Degranulation der Zellen. Von einer erfolgreichen Blockade des Fc $\epsilon$ -RI, ohne Stimulierung der Zellen, berichteten HAAK-FRENDSCHO et al. (1993). Es gelang ihnen durch ein Fc $\epsilon$ -RI-IgG-Immoadhäsion in-vitro und in-vivo im murinen System IgE-vermittelte anaphylaktische Reaktionen zu hemmen. Die Expression von Fc $\epsilon$ -RI auf der Zelloberfläche ist positiv an den Serum-IgE-Spiegel gekoppelt. Erhöhte IgE-Gehalte im Serum führten im murinen und humanen System zur Heraufregulierung der Rezeptorexpression von Mastzellen und basophilen Granulozyten, wohingegen eine Behandlung mit Antikörpern gegen IgE eine verminderte Expression auf Basophilen zur Folge hat (COSTA et al. 1997). Anti-Fc $\epsilon$ -RI-Antikörper werden bereits erfolgreich als Therapeutikum bei allergischem Asthma eingesetzt (CHANG 2000). Die Tatsache, dass physiologisch Autoantikörper gegen IgE vorkommen, führte zu Versuchen, eine im Rahmen der Allergiebehandlung nützliche anti-IgE-Autoimmunantwort durch Vakzinierung zu erhalten, was beim Affen bereits gelang (STADLER et al. 2001). Neben dem Fc $\epsilon$ -Rezeptor I werden auch andere Fc-

Rezeptoren auf der Zelloberfläche von Mastzellen und basophilen Granulozyten exprimiert, so IgG-bindende Rezeptoren (Fcγ-RI, Fcγ-RII und Fcγ-RIII) und, zumindest nach Vorbehandlung mit IL-3, IL-5 oder GM-CSF, ein Rezeptor, der sekretorisches IgA bindet (GALLI 2000). Einer dieser Rezeptoren, der niederaffine Rezeptor Fcγ-RIIB, ist in der Lage, die durch Fcε-RI vermittelte Aktivierung der Zellen zu hemmen, wenn beide Rezeptortypen durch den selben multivalenten Liganden gebunden werden (DAERON et al. 1995). Eine solche Bindung kann zustande kommen, wenn ein Antigen/Allergen sich an zellständiges IgE bindet, das bereits an anderen Epitopen IgG gebunden hat. Das IgG seinerseits kann dann über den Fc-Teil den Fcγ-Rezeptor binden (OTT et al. 2002). ZHU et al. (2002) entwickelten aus diesem Ansatz heraus ein Protein, welches gleichzeitig Fcε-RI und Fcγ-RII binden kann. In-vitro konnte durch dieses Protein eine Hemmung der IgE vermittelten Histaminausschüttung bewirkt, sowie im murinen Modell in-vivo anaphylaktische Reaktionen verhindert werden. Das therapeutische Potential solcher Substanzen in der Behandlung von Typ I-Allergien ist noch unerforscht. Sowohl Mastzellen, als auch basophile Granulozyten können durch eine Reihe von Substanzen unabhängig vom Fcε-RI aktiviert werden. Dazu gehören Bakterien- und Parasitenprodukte (z.B. Lipopolysaccharide, Adhäsine), Chemokine sowie Komplementfaktoren (C5a). Einige dieser Substanzen sind in der Lage die Mediatorfreisetzung zu modulieren, d.h. nur bestimmte Mediatoren freizusetzen oder diese nur in geringen Mengen oder aber sehr langsam auszuschütten. (GALLI 2000; HAYGLASS et al. 2000). Allerdings ist bisher noch unklar, inwieweit solche Substanzen für einen therapeutischen Einsatz geeignet sind.

Die gezielte Immunmodulation im Rahmen der Therapie von Typ I-Allergien gestaltet sich schwierig, da die Regelmechanismen des Immunsystems und ihre Interaktionen zurzeit nur bruchstückhaft bekannt sind. Ein Eingreifen in diese fein abgestimmten Regelkreise hat in der Regel schwer zu überschauende und manchmal überraschende Folgen. Zum anderen muss man sich hier vor Augen halten, dass es sich bei den unter der Allergie ablaufenden Vorgängen um prinzipiell notwendige Mechanismen des Immunsystems handelt. Der Versuch, die pathologische Situation zu beeinflussen, kann unter Umständen relevante Immunfunktionen beeinträchtigen und so zu unerwünschten Nebenwirkungen führen bis hin zur Exazerbation des allergischen Leidens. Zusätzlich basieren die aufgeführten Erkenntnisse auf dem humanen oder murinen System – eine Projektion auf equine Allergiemechanismen kann also nur richtungsweisend verstanden werden.

Beim Pferd liegen die Haupteinsatzgebiete der Immunmodulatoren derzeit in der Behandlung chronischer Atemwegserkrankungen und des equinen Sarkoids. Hierfür

steht der Pferdemedizin momentan eine Vielzahl immunmodulatorisch wirksamer Substanzen zur Verfügung. Die meisten dieser Immunmodulatoren stellen relativ grobe Präparationen bakteriellen, viralen oder pflanzlichen Ursprungs dar. Beispiele hierfür sind Präparationen aus *Propionibacterium acnes*, *Mycobacterium bovis* (BCG), *Parapox ovis* oder *Acemannan* (*Aloe vera*). Auch einigen synthetischen Produkten werden immunmodulatorische Fähigkeiten zugeschrieben z.B. Levamisol. Neben diesen exogenen Modulatoren werden auch endogene Substanzen eingesetzt, u.a. Interferon  $\alpha$  und der Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (G-CSF) (RUSH 2001).

GRAMMEL und MÜLLER (1989) berichten von Therapieerfolgen durch den Einsatz eines Immunmodulators beim Sommerexzem. Die von ihnen verwendeten biologisch aktiven Peptide sind Stoffwechselprodukte von Kolibakterien (Colibiogen®) und führen ihren Angaben nach zur Stimulation der nichterregerspezifischen Immunabwehr, zur Stoffwechselsteigerung von Zellen, zur Hemmung der Histaminfreisetzung und zur „Normalisierung“ der B-T-Lymphozytenrelation. In der von ihnen durchgeführten klinischen Studie konnte trotz hohen therapeutischen Aufwands (zweimal wöchentlich stattfindende intramuskuläre Injektion von März bis September) nur ein Teilerfolg beobachtet werden. Von den sieben behandelten Tieren zeigten sich zwei Tiere deutlich gebessert, zwei weitere leicht gebessert. Bei den übrigen drei Pferden wurde die Therapie mangels Erfolg abgebrochen. Zu dieser Studie muss allerdings kritisch angemerkt werden, dass zum einen nur eine sehr geringe Anzahl an Pferden behandelt wurde, die zudem verschiedenen Rassen angehörten und unter verschiedenen Bedingungen gehalten wurden, zum anderen wurden Ausgangssituation sowie Therapieerfolg ausschließlich subjektiv durch die Besitzer beurteilt. Der wissenschaftliche Wert solcher Untersuchungen ist fraglich.

## **3 Material und Methode**

### **3.1 Studiendesign und Ziele**

Ziel dieser placebokontrollierten Blindstudie war es, den Einfluss von Insol® Dermatopyhton (ID) in einer Feldstudie an mit Sommerekzem erkrankten Pferden zu eruieren.

Außerdem sollte untersucht werden, ob durch die Verabreichung von ID ein spezifischer immunmodulatorischer Effekt auf equine Leukozyten nachgewiesen werden kann.

### **3.2 Anamnesebögen**

Der Vorbericht der Patienten zum Sommerekzem wurde vor Beginn der Feldstudie anhand eines Fragebogens erhoben (Anhang 9.1). Die hierbei im Vordergrund stehenden Fragen waren:

- Rasse (es wurde vor allem Wert auf eine breite Rassenvielfalt gelegt)
- Alter
- Dauer des Besitzes (es wurden Pferde bevorzugt, die mindestens seit zwei Jahren in Besitz waren)
- Dauer des Ekzems
- Einteilung in Jung- (<2 Jahre an SE erkrankt) und Alt-(>2 Jahre an SE erkrankt) Ekzemer
- Entwurmungsregime der Tiere
- Einschätzung des Schweregrads des SE durch die Besitzer
- Behandlungsversuche bis zum Studienbeginn
- Standort

### **3.3 Patientengut**

An der Studie nahmen 51 an Sommerekzem erkrankte Pferde teil, die seit mindestens einem Jahr entsprechende Symptome zeigten. Die Gruppe der Studienpferde setzte sich aus 40 Wallachen, 16 Stuten und fünf Hengsten zusammen, wobei drei der Hengste im Verlauf der Studie kastriert wurden. Das Durchschnittsalter der Pferde betrug 10 Jahre  $\pm$  6,1 Jahre, wobei das jüngste Pferd zwei, das Älteste 31 Jahre alt

war. Das Durchschnittsgewicht lag bei 491 kg  $\pm$  156 kg, wobei zehn Pferde ein Gewicht von unter 400 kg aufwiesen, was der Schwellenwert für die ID Dosierung war (Anhang 9.3). Die Einteilung in Verum- und Placebogruppe fand zufällig statt. Jedes Pferd erhielt chronologisch bei der Erstuntersuchung eine Nummer der durchnummerierten Verum- bzw. Placeboflaschen, die äußerlich nicht zu unterscheiden waren, und nach dem Zufallsprinzip verpackt wurden. Diese behielten sie bis zum Schluss der Studie bei (Anhang 9.2). Von den 51 Pferden waren 27 Pferde in der Verum- und 24 in der Placebogruppe. Im Einzelnen waren dies in der Verumgruppe die Nummern 2, 4, 6, 7, 10, 12, 13, 16, 17, 19, 21, 24, 26, 28, 29, 31, 33, 36, 38, 40, 42, 43, 46, 47, 50, 51 und 53. In der Placebogruppe die Nummern 1, 3, 5, 8, 9, 11, 14, 15, 18, 20, 22, 23, 25, 27, 30, 32, 34, 35, 37, 39, 41, 44, 45 und 48.

### **3.4 Studienablauf**

Die Feldstudie wurde im Zeitraum von Februar bis November 2011 (Tabelle 1) durchgeführt und gliederte sich in drei Teile:

Die Erstuntersuchung (EU) fand im Februar statt und umfasste die Allgemeinuntersuchung der Pferde, die Ausprägung des Sommerrekzems mittels eines für diese Studie entwickelten Score-Systems, sowie die Dokumentation des aktuellen Zustands mittels Fotos. Des Weiteren wurde allen Pferden Blut für die Durchführung von speziellen Allergietests (FIT und CAST) und für die Bestimmung spezifischer Zytokine entnommen.

Im Anschluss wurden die Pferde das erste Mal mit ID oder Placebo geimpft. Die Impfung erfolgte daraufhin noch zwei Mal im Abstand von je zwei Wochen. Dabei wurde auch jedes Mal vor der Injektion Blut für die Bestimmung der Zytokine genommen.

Im Rahmen der ersten drei Besuche wurde, soweit möglich, eine Kotprobe von den Pferden gesammelt und an das Institut für Parasitologie in München geschickt, um einen eventuellen Zusammenhang zwischen einer möglichen Verwurmung und den Ergebnissen der Allergietests herzustellen.

Bei der Zwischenuntersuchung (ZU) von Mitte Juni bis Mitte Juli wurden die Pferde erneut mittels des Score-Systems beurteilt und der Zustand photographisch dokumentiert. Im Anschluss wurden wiederum Blutproben für die Zytokinbestimmung genommen.

Die Abschlussuntersuchung (AU) der Patienten fand schließlich im November statt. Hierbei wurde ebenfalls der aktuelle Zustand von Fell und Haut der Patienten anhand des Score-Systems ermittelt und mit Fotos dokumentiert.

Im Rahmen dieses Besuchs wurden erneut Blutproben für die Durchführung des FIT, des CAST und für die Zytokinbestimmung entnommen, sowie Kotproben gesammelt.

Die gesamte Studie inklusive aller Untersuchungen und Auswertungen wurde von der gleichen Person durchgeführt.

Die Studie wurde als Tierversuch bei der Regierung von Oberbayern angemeldet und als solcher genehmigt.

**Tabelle 1:** Chronologischer Studienablauf.

<u>Zeitpunkt</u>	<u>Maßnahme</u>	<u>Parameter</u>
Herbst Vorjahr	Fragebogenaktion	
Februar Untersuchungsjahr Tag 1	Allgemeinuntersuchung	
	Beurteilung mittels Score-System	
	Fotodokumentation	
	Blutentnahme (1)	Zytokine (IL-1, IL-4, IL-10, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ )
	Insol® Dermatopyhton (ID) oder Placebo Injektion (1)	
	FIT I	
	CAST I	
Februar/März Tag 14	Blutentnahme (2)	Zytokine (IL-1, IL-4, IL-10, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ )
	ID oder Placebo Injektion (2)	
März Tag 28	Blutentnahme (3)	Zytokine (IL-1, IL-4, IL-10, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ )
	ID oder Placebo Injektion (3)	
Juni/Juli	Beurteilung mittels Score-System	
	Fotodokumentation	
	Blutentnahme (4)	Zytokine (IL-1, IL-4, IL-10, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ )
November	Beurteilung mittels Score-System	
	Fotodokumentation	
	Blutentnahme (5)	Zytokine (IL-1, IL-4, IL-10, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ )
	FIT II	
	CAST II	

### 3.5 Blutprobenentnahme

Die Blutprobenentnahme erfolgte unter sterilen Kautelen aus der gestauten V. Jugularis. Dazu wurden die Pferde teilweise, aufgrund sehr dichten Winterfells, rasiert. Danach erfolgten die Desinfektion und die Blutprobenentnahme.

### 3.6 Injektion von Insol® Dermatophyton oder Placebo

Die Injektion von ID oder Placebo erfolgte bei allen Pferden drei Mal im Abstand von je zwei Wochen. Hierbei wurde die doppelte der normalen, bei Hautpilzkrankungen angewandten und vorgegebenen Menge ID/Placebo (0,6 ml für Pferde unter 400 kg KM; 1,0 ml für Pferde über 400 kg KM) injiziert. Das Gewicht wurde mittels eines Gewichtsmaßbandes ermittelt. Die Placebolösung bestand aus der Nährlösung für ID ohne die in ID verwendeten Pilzstämme (Inhaltsstoffe: 0,04 mg/ml Thiomersal, Glucose, Fleischextrakt, Wasser für Injektionszwecke).

Die Injektion erfolgte nach vorheriger Desinfektion tief intramuskulär in die Brustmuskulatur mit wechselnden Körperseiten (Schema links-rechts-links). Bei den drei kleinsten Ponys erfolgte die Injektion in die Hinterhandmuskulatur, da die Brustmuskulatur kaum ausgeprägt war. Das Schema (links-rechts-links) wurde auch hier eingehalten.

Die Besitzer wurden im Vorhinein über mögliche Nebenwirkungen (lokale Schwellung/Infektion) aufgeklärt und waren mit der Teilnahme an der Studie einverstanden. Dies wurde auch schriftlich festgehalten und bestätigt.

### 3.7 Untersuchungen

#### 3.7.1 Allgemeinuntersuchung

Die Allgemeinuntersuchung wurde im Rahmen des Erstbesuchs der Pferde vor allen anderen Untersuchungen durchgeführt.

Sie umfasste folgende Punkte:

- Datum
- Name und Nummer des Pferdes
- Allgemeinverhalten
- Ernährungszustand

- Hautelastizität
- Herzfrequenz
- Atemfrequenz
- Lidbindehäute
- Maulschleimhaut und Kapillarfüllzeit
- Innere Körpertemperatur
- Gewicht (ermittelt mittels Gewichtsmaßband)

### 3.7.2 Sommerekzem-Score

Der in dieser Studie verwendete Sommerekzem-Score wurde eigens dafür entwickelt und orientierte sich an dem von OLIVRY (2006) entwickelten und etablierten „Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index“ (CADESI) für Hunde. Hierzu wurden die 12 häufigsten Sommerekzemstellen (Kopf, Schopf, Hals 1/3, Hals 2/3, Hals 3/3, Brustwirbelsäule, Vorderbrust, Lendenwirbelsäule/Kruppe, Hinterhand caudal, Schweif, Bauchnaht, Schenkelspalt Hinterextremitäten) (Abbildung 4) mit den fünf wichtigsten Symptomen (Haarbruch, Alopezie, blutige/eitrige Hautveränderungen, Hautverdickung, Schuppen) in Verbindung gesetzt. Für jede Stelle und jedes Symptom musste der Schweregrad nach folgendem Schema angegeben werden:

0 = keine Symptome

1 = geringgradige Symptome

2-3 = mittelgradige Symptome

4-5 = hochgradige Symptome

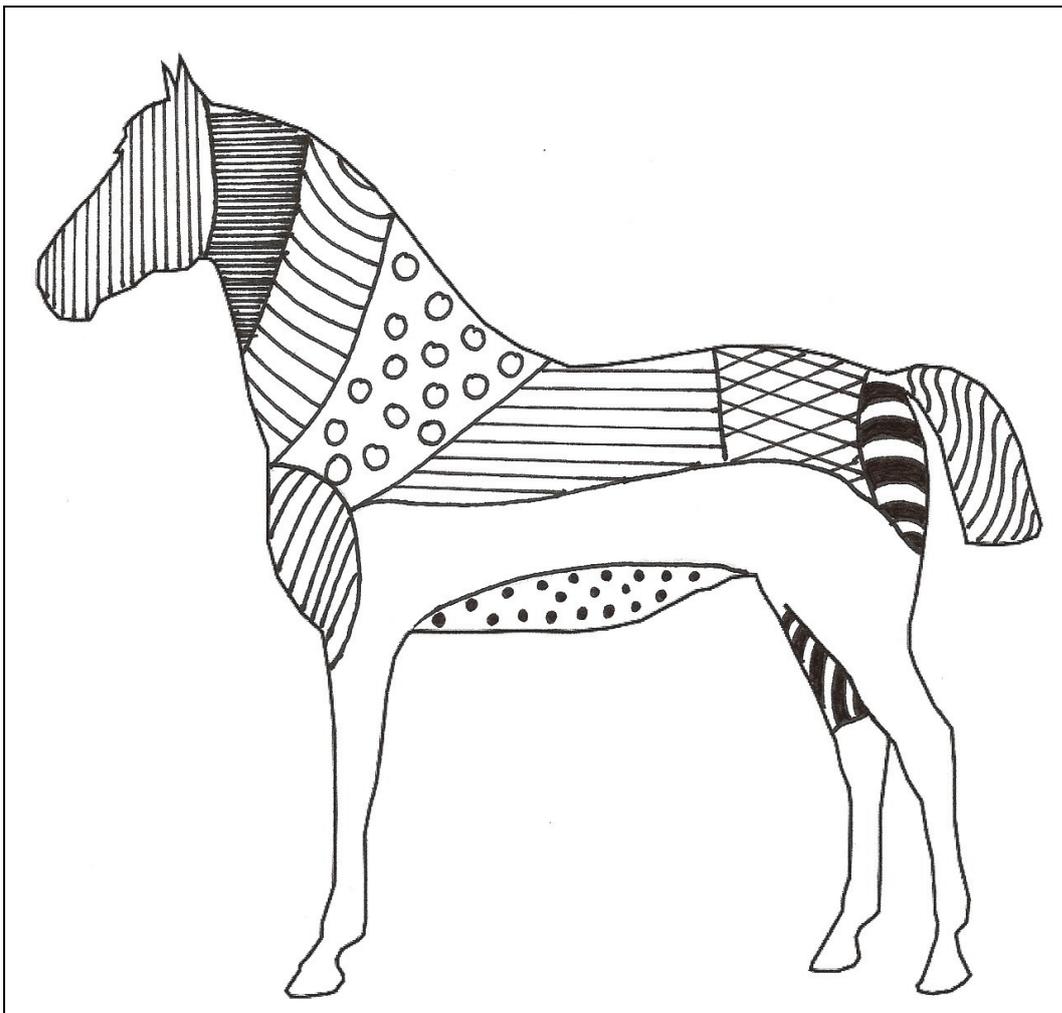
Hiermit ließen sich nun folgende Punkte untersuchen:

- Gesamtpunktesumme pro Pferd und Untersuchungszeitpunkt  
(max. 300 Punkte/Pferd/Untersuchung:  
12 Regionen x 5 Symptome x 5 Schweregrade)
- Gesamtpunktesumme der einzelnen Regionen  
(Region x 5 Symptome x 5 Punkte x Anzahl Pferde)
- Gesamtpunktesumme der einzelnen Symptome  
(Symptom x 12 Regionen x 5 Punkte x Anzahl der Pferde)

Mit Hilfe dieses Scores wurde der Fell-/Haut-Zustand der Pferde bei der Erstuntersuchung (EU) im Februar/März 2011, bei der Zwischenuntersuchung (ZU) im Juni/Juli 2011 und bei der Abschlussuntersuchung (AU) im November 2011 beurteilt.

Des Weiteren wurde jedem Pferd zu jedem Untersuchungszeitpunkt eine „Gesamtnote“ (Einteilung 0 bis 5) gegeben, die den momentanen Gesamtzustand des Pferdes zu jedem Untersuchungszeitpunkt widerspiegelte. Da sich verschiedene Symptome unterschiedlich auf den Gesamtzustand auswirkten, (z.B. blutig/eitrige Veränderungen sind schwerwiegender als Schuppen) konnten die Gesamtpunktzahl und die Gesamtnote unter Umständen etwas differieren.

Die Verumgruppe wurde, nach Entblinden der Studie, zusätzlich in Jung- bzw. Altekzemer unterteilt. Hierbei betraf die Einteilung laut Definition nicht das tatsächliche Alter der Tiere, sondern erfolgte aufgrund der bisherigen Dauer der Symptome. So wurde „Jungekzemer“ als seit maximal zwei Jahren an Sommerexzem erkrankt definiert. „Altekzemer“ bedeutete, dass der Patient seit mehr als zwei Jahren an Sommerexzem erkrankt war.



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der 12 exprimierten Sommerexzemstellen.

### 3.7.3 Blutuntersuchungen

#### 3.7.3.1 Funktioneller in-vitro Test (FIT)

Der FIT wurde, ebenso wie der CAST, sowohl bei der Erst- (FIT I/CAST I) als auch bei der Abschlussuntersuchung (FIT II/CAST II) durchgeführt.

Hierfür wurden jedem Pferd 20 ml venöses EDTA-Blut entnommen und per Overnight-Express (TNT Express) am selben Tag an das Institut für Immunologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover geschickt, wo es umgehend bearbeitet wurde.

Im Labor wurde das Blut schließlich auf eine mögliche allergische Reaktionsbereitschaft auf folgende Insektenallergene untersucht: Gnitze, Wadenstecher, Kriebelmücke, Eintagsfliege, Motte, Stechmücke, Pferdebremse und Hausfliege.

Die Auswertungsskala dieses Tests lag zwischen 0 (= keine Reaktion) und 4 (=hochgradige Reaktion). Ergebnisse von 0,5 gelten als fraglich positiv.

#### 3.7.3.2 CAST

Für den CAST wurden ebenfalls 20 ml venöses Blut in den vom Labor zur Verfügung gestellten „ACD-B Vacuetten“ am Tag der Blutentnahme per laboreigenem Kurier ins Labor geschickt und dort ausgewertet.

Hier wurde die Reaktionsbereitschaft der vier wichtigsten sommerekzemauslösenden Insekten getestet. Im Einzelnen waren das Gnitze, Bremse, Kriebelmücke und Stechmücke. Werte über 250 pg/ml galten als Schwellenwert für positive Reaktionsbereitschaft, wobei die Höhe des Wertes keine Aussage über den Schweregrad der Erkrankung lieferte.

#### 3.7.3.3 Zytokinbestimmung

##### 3.7.3.3.1 Native Proben

Für die Zytokinbestimmungen wurden bei jedem Besuch der Pferde (insgesamt fünf Mal) Serumproben genommen. Dazu wurden 20 ml venöses Blut entnommen und in zwei Serumröhrchen aufgeteilt. Diese wurden nach der Blutprobenentnahme in einer Zentrifuge (EBA 20, Hersteller Hettich) je 10 Minuten bei 1500 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde der Serumüberstand abpipettiert und als Doppelproben in

beschriftete Cryoröhrchen (CryoPure Tubes, Firma Sarstedt, D-Nümbrecht) überführt. Diese wurden dann in flüssigem Stickstoff (-196 °C) eingefroren. In regelmäßigen Abständen wurden alle Proben von dem Stickstoffcontainer in einen -80°C Kühlschrank umgesetzt. Hier wurden sie bis zum Tag der Auswertung gelagert. Am Tag der Auswertung wurden die Proben entnommen und mittels einer gekühlten Styroporbox zum Klinikum München Rechts der Isar befördert, wo sie im dortigen Labor ausgewertet wurden.

Im Hinblick auf den immunologischen Hintergrund des zu erwartenden Th2/Th1-Shifts wurden die Schlüsselzytokine IL-4 (Th2) und IFN- $\gamma$  (Th1), sowie IL-10 (Th2) bestimmt. Des Weiteren das Th1- Zytokin TNF $\alpha$  und das in der Humanmedizin im Hinblick auf Allergien aktuell vermehrt untersuchte IL-1.

Die ausgewählten Zytokine (IL-1, IL-4, IL-10, INF $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) wurden mittels eines Sandwich-ELISA der Firma R&D-Systems (Minneapolis, USA) bestimmt.

Hierbei wird das gesuchte natürliche oder rekombinante Antigen zwischen zwei spezifischen Antikörpern gebunden wie zwischen den Brotscheiben eines Sandwichs.

Jedes „Duoset“ enthielt Material, um ca. fünfzehn 96-well Platten analysieren zu können.

Der erste Antikörper („capture antibody“) wurde zu einer spezifischen Arbeitskonzentration („working concentration“) mit PBS („phosphate buffered salt solution: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCL, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2-7,4; 0,2  $\mu$ m filtriert) verdünnt und in einer Menge von 100  $\mu$ l/well auf die dafür vorgesehene ELISA-Platte (Thermo Fisher Scientific, Rokshile Site, Dänemark) pipettiert und bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Dieser bildete den Boden des „Sandwichs“.

Am nächsten Tag wurden die nicht am Boden der ELISA-Platte gebundenen Antikörper zur Vermeidung von Interferenzen durch dreimalige Spülung und nachfolgende Aspiration mit 400  $\mu$ l/well Waschpuffer (0,05% Tween® in 20 PBS, pH 7,2-7,4) mittels des automatischen Immuno Wash Modell 1575 (Bio-rad laboratories, München/Deutschland) entfernt. Am Ende des Waschvorgangs wurde die unter Umständen noch verbleibende Restflüssigkeit durch kräftiges Klopfen der umgedrehten Platte auf Zellstoff entfernt.

Im nächsten Schritt wurden die frei gebliebenen Bereiche zwischen dem gebundenen „capture antibody“ mit 300  $\mu$ l/well Blockpuffer (reagent diluent: 1% bovin serum albumin in PBS, pH 7,2-7,4; 0,2  $\mu$ m filtriert) geblockt. Damit wurden unspezifische

Bindungen an den Boden der ELISA-Platte verhindert. Dieser Vorgang benötigte mindestens 60 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur.

Danach wurde der restliche Blockpuffer durch erneutes dreimaliges Waschen und Aspirieren der Flüssigkeit mit Waschpuffer entfernt.

Nachdem die Platten nun vorbereitet waren, erfolgte der eigentliche Ansatz. Dazu wurden pro well 100 µl Probenmaterial bzw. Standard aufgetragen und die Platte mit adhäsiver Folie bedeckt und bei Raumtemperatur zwei Stunden inkubiert.

Im Anschluss daran wurden die nicht gebundenen Anteile durch erneutes dreimaliges Waschen entfernt. Letztlich wurden 100 µl/well des in entsprechender Arbeitskonzentration mit „reagent diluent“ verdünnten „detection antibody“ hinzugefügt und die Platten erneut für zwei Stunden inkubiert.

Nach Ablauf der Zeit wiederholte sich der dreimalige Waschvorgang. Nun wurde das an Streptavidin gebundene Enzym „horseradish-peroxidase“ (HRP) zugegeben. Auch dieses Reagenz wurde zuvor in der entsprechenden Arbeitskonzentration mit „reagent diluent“ hergestellt. Pro well wurden 100 µl der Streptavin-HRP hinzugefügt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur und Vermeidung von direktem Lichteinfall inkubiert.

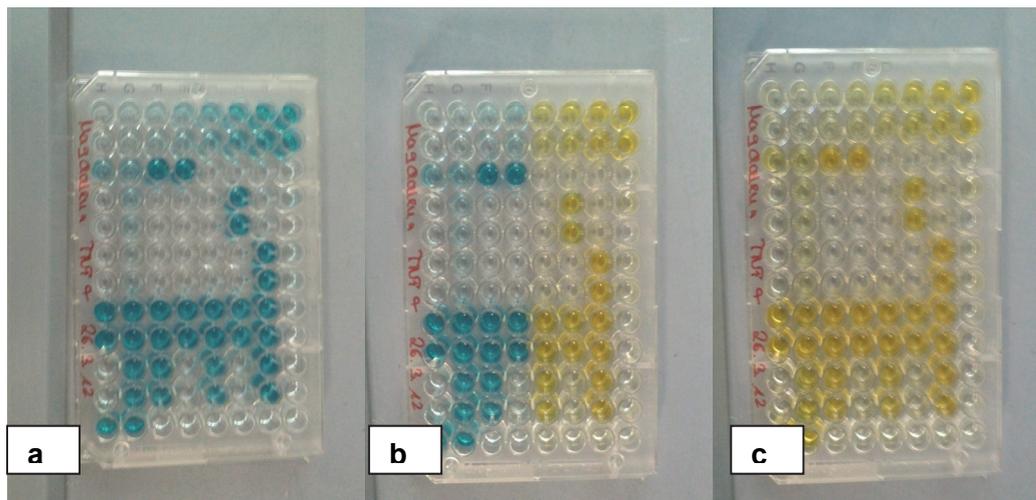
Auch nach diesem Schritt werden die Platten dreimal gewaschen, um ungebundenes Reagenz zu entfernen. Um die Reaktionen auf den Platten sichtbar zu machen, wurden nun 100 µl/well „substrate solution“ (Mischung 1:1 von „color reagent A“ (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und „color reagent B“ (Tetramethylbenzidin) hinzugegeben und wieder 20 Minuten bei Raumtemperatur und Vermeidung von direktem Lichteinfall inkubiert.

Waren die Proben positiv auf das entsprechende Zytokin, zeigte sich eine blaue Verfärbung (Abbildung 5a).

Um die Reaktion anschließend zu stoppen, wurden 50 µl/well einer „stop solution“ (2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) zugegeben und die Platten sanft geklopft, um eine einwandfreie Vermischung zu gewährleisten. Es zeigte sich ein Farbumschlag nach gelb (Abbildung 5b/5c), welcher nun photometrisch mittels Wallac Victor Multilabel Counter (Perkin Elmer, Fremont/USA) quantitativ photometrisch bestimmt werden konnte.

Die Nachweisgrenzen der verwendeten ELISA-Sets lagen bei:

- 156,25-20000 pg/ml (IL1)
- 15,625 – 2000 pg/ml (IL-4)
- 156,25 – 20000 pg/ml (IL-10)
- 31,25 – 4000 pg/ml (INF $\gamma$ )
- 15,625 – 2000 pg/ml (TNF $\alpha$ ).



**Abbildung 5:** ELISA-Farbreaktion. Nach Zugabe des Substrats kommt es durch den Enzym-gekoppelten Sekundärantikörper zu einer blauen Farbbildung (a). Diese Reaktion wird nach 20 Minuten durch Zugabe von Schwefelsäure gestoppt, wodurch es zu einem Farbumschlag nach gelb (b) kommt, welcher photometrisch bestimmt wird (c).

#### 3.7.3.3.2 Verdünnte Proben

Da bei vielen Pferden die photometrisch gemessenen optischen Dichten (O.D.) über dem jeweils vom Hersteller angegebenen höchsten Standardwert lagen, mussten diese Proben verdünnt werden, um einen berechenbaren Wert der Konzentration der jeweiligen Probe zu erhalten.

Die Verdünnung erfolgte mit sterilen 0,9 % NaCl und erfolgte nach den gängigen Verdünnungsschemata für ELISA Proben.

Die Verdünnungsstufen bis 1:100 wurden in jeweils einem Schritt durchgeführt, ab der Verdünnung 1:200 erfolgte diese in zwei Schritten, um die Messgenauigkeit zu erhöhen.

Bei der einstufigen Verdünnung wurde die jeweils benötigte Menge NaCl in ein 2 ml Eppendorfgefäß vorgelegt (z.B. für die Verdünnung 1:100, 990 µl). Dann wurde die aufgetaute Serumprobe mittels Vortexmischer gemischt und mehrfach geschwenkt, um eine gleichmäßig verteilte Probe zu erhalten. Anschließend wurde die jeweilige Menge (z.B. 10 µl bei der Verdünnung 1:100) mit einer Pipette, nach mehrmaligem Auf- und Abpipettieren zum nochmaligen Durchmischen der Probe, aufgezogen und in das Eppendorfgefäß dazugegeben. Direkt vor dem Auftragen auf die ELISA-Platte wurde das Eppendorfgefäß nochmals gevortext um ein gleichmäßiges Gemisch zu erhalten.

Bei den Verdünnungsstufen ab 1:200 wurde erst 1:10 verdünnt und aus dieser Verdünnung dann die jeweils benötigte Verdünnungsstufe erstellt, da das Pipettieren von 1 µl (bei einstufiger Verdünnung notwendig) sehr ungenau und mit großen Verlusten gekennzeichnet ist.

So wurden z.B. für die Verdünnung 1:200 im ersten Schritt 90 µl NaCl vorgelegt und 10 µl Proben dazugegeben. Nach gründlichem Vortexen wurden daraus 50 µl entnommen und in ebenfalls bereits vorgelegte 950 µl NaCl gegeben (1:20); aus dieser Verdünnung wurden nach wiederum gutem Vortexen die Proben zum Befüllen der Wells entnommen. Es wurden die Verdünnungsstufen 1:50, 1:80; 1:100, 1:200, 1:500, 1:800 und 1:1000 verwendet. Anschließend wurden die Werte der verdünnten Proben auf die ursprüngliche in der Probe enthaltene Konzentration rückgerechnet.

Die im Rahmen der Laboruntersuchung gewonnenen O.D. Werte wurden schließlich mittels Prism 5 Software (GraphPad software Inc., La Jolla, USA) in die jeweiligen Konzentrationen umgerechnet. Hierbei wurde für jedes Zytokin mittels oben genannter Software die passendste Standardkurve errechnet. Dies geschah folgendermaßen: es wurde jeder O.D. Wert der Standardlösung auf der y-Achse, die Konzentration des jeweiligen Wertes auf der x-Achse eingetragen. Daraufhin wurde die Kurvenform ausgewählt, die die geringste Streuung zwischen den einzelnen Punkten aufwies. Hierbei lieferten die beiden Gleichungen „two phase decay“ bzw. „polynomial“ die besten Ergebnisse.

### 3.8 Effekt der Insol® Dermatophyton Behandlung im Vergleich zum Vorjahr

Bei der Zwischenuntersuchung im Sommer 2011 bekamen die Pferdebesitzer einen fünfseitigen Fragebogen (Anhang 9.6), in dem sie die Stärke und Ausprägung des SE ihrer Pferde anhand einer visuellen Analogskala (VAS) für das Jahr 2010 und 2011 beurteilen sollten.

Hierbei sollten sie im Vergleich der beiden Jahre den Zeitpunkt und die Zeitspanne der stärksten Symptome, die Stärke der Symptome an den bei SE am häufigsten betroffenen Stellen (Mähne, Schweif, Unterbauch, Kopf und Brust) und die allgemeine Ausprägung des SE angeben. Außerdem konnten sie unter dem Punkt „Sonstiges“ noch Stellen nennen, die bei ihrem Pferd individuell stark betroffen waren. Abschließend wurden sie noch befragt, ob sie außer ID eine Behandlungsänderung von 2010 auf 2011 vorgenommen hatten.

### 3.9 Kotuntersuchung

Im Rahmen der Erst-, sowie der Abschlussuntersuchung wurde von 34 (Erstuntersuchung) bzw. 14 Pferden (Abschlussuntersuchung) stichprobenartig Kotproben gesammelt um einen eventuellen Zusammenhang der Ergebnisse der Allergietests mit den Ergebnissen der Kotproben herzustellen. Da viele der Probanden im Offenstall lebten, war es nicht möglich von allen Pferden eine Kotprobe zu bekommen.

Die Kotproben wurden gekühlt an den Lehrstuhl für vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie in München geschickt. Dort wurden sie mittels folgender Methoden ausgewertet: kombinierte Flotation/Sedimentation, McMaster-Methode und Auswanderverfahren. Die Ergebnisse wurden schließlich den Ergebnissen der Allergietests und dem Score gegenübergestellt.

### 3.10 Statistik

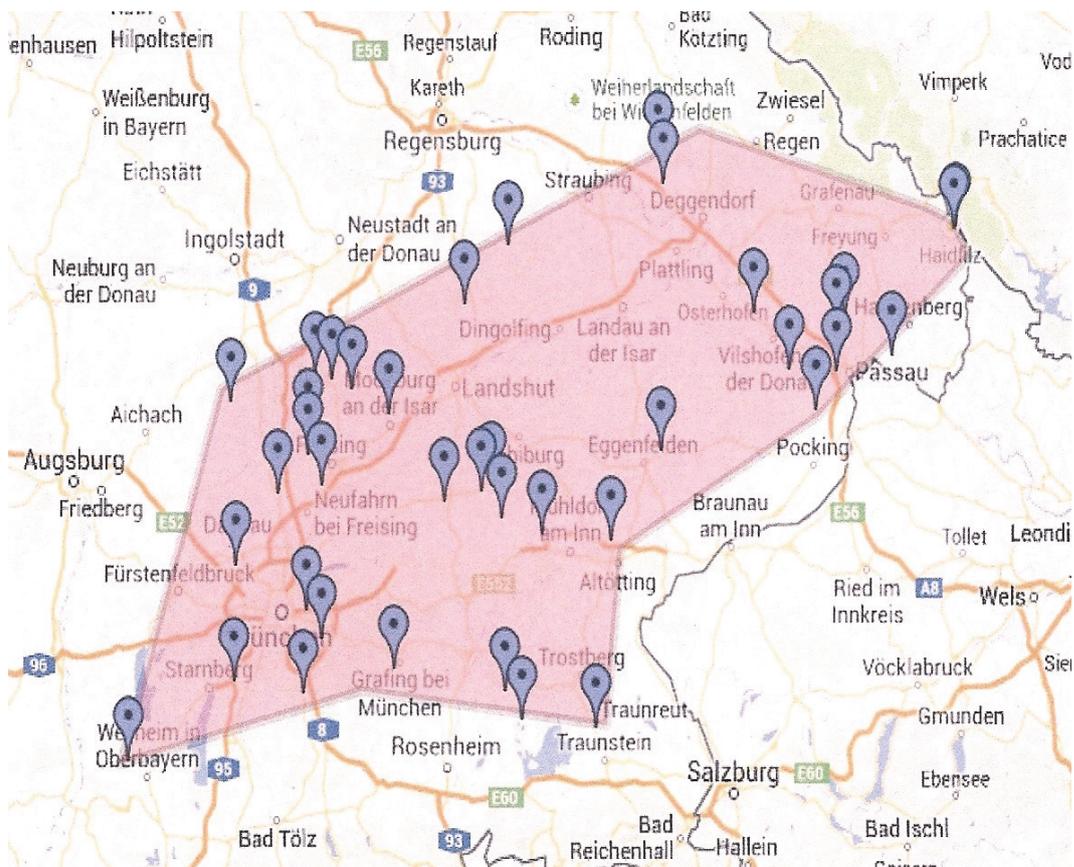
Die statistische Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel Version 2000 sowie dem statistischen Programmpaket SPSS für Windows Version 15.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Die Berechnung der statistisch notwendigen Gruppengröße erfolgte mittels Bias für Windows 9.03. Hierbei wurde mit der Software G\*Power (Faul et al. 2007) ein Stichprobenumfang von 21 Pferden je Gruppe (Verum, Placebo) berechnet, wenn man von einem  $\text{cohen's}_d$  von 0,8 sowie einer Power von 0,8 und  $p \leq 0,05$

ausgeht. Da über den Untersuchungszeitraum durch Krankheit, Verkauf und Besitzerwechsel mit einem Ausfall von Pferden zu rechnen war, wurden Reservepferde eingeplant, wodurch letztendlich die Untersuchungsgruppe 51 Pferde umfasste. Für den Vergleich der beiden Gruppen zueinander (Verum/Placebo) wurden Tests für unabhängige Stichproben verwendet, da es sich um zwei völlig unabhängige Gruppen handelte. Für die Vergleiche innerhalb einer Gruppe (Verum oder Placebo) zu den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten wurden Tests für abhängige Stichproben verwendet. Im Einzelnen wurde für die Auswertung der Scores der rangbasierte Korrelationskoeffizient nach Spearman, der Test nach RAATZ und der T-Test verwendet. Um ein noch genaueres Ergebnis hinsichtlich der ID Wirkung zu bekommen, wurden sogenannte „matched-pairs“ gebildet. Dies bedeutet, dass fiktive Pärchen gebildet wurden, wobei immer einem Verum Pferd das punktgleich passende oder nächstpassende Placebo Pferd mit ähnlicher Rasse und Alter bei der Erstuntersuchung zugeordnet wurde. So erhielt man den direkten Vergleich auch bei den anderen Untersuchungszeitpunkten. Bei den „matched-pairs“ handelte es sich um abhängige Stichproben, die mittels Wilcoxon-Test statistisch analysiert wurden. Dieser Test wurde ebenfalls bei der Auswertung der Zytokine und dem Fragebogen zu den Jahresvergleichen angewandt. Für den Vergleich des FIT mit der klinischen Ausprägung (Score) wurde die Korrelation nach Spearman verwendet. Die Gegenüberstellung FIT und Ergebnis der Kotproben wurde mittels FISHER-Exact-Test durchgeführt, ebenso wie für den Vergleich der Allergietests. Hierfür wurde ebenfalls noch der Chi<sup>2</sup>-Test verwendet. Für die Interpretation der resultierenden p-Werte wurde ein lokales Signifikanzniveau von 5 % ( $p \leq 0,05$ ) festgelegt.

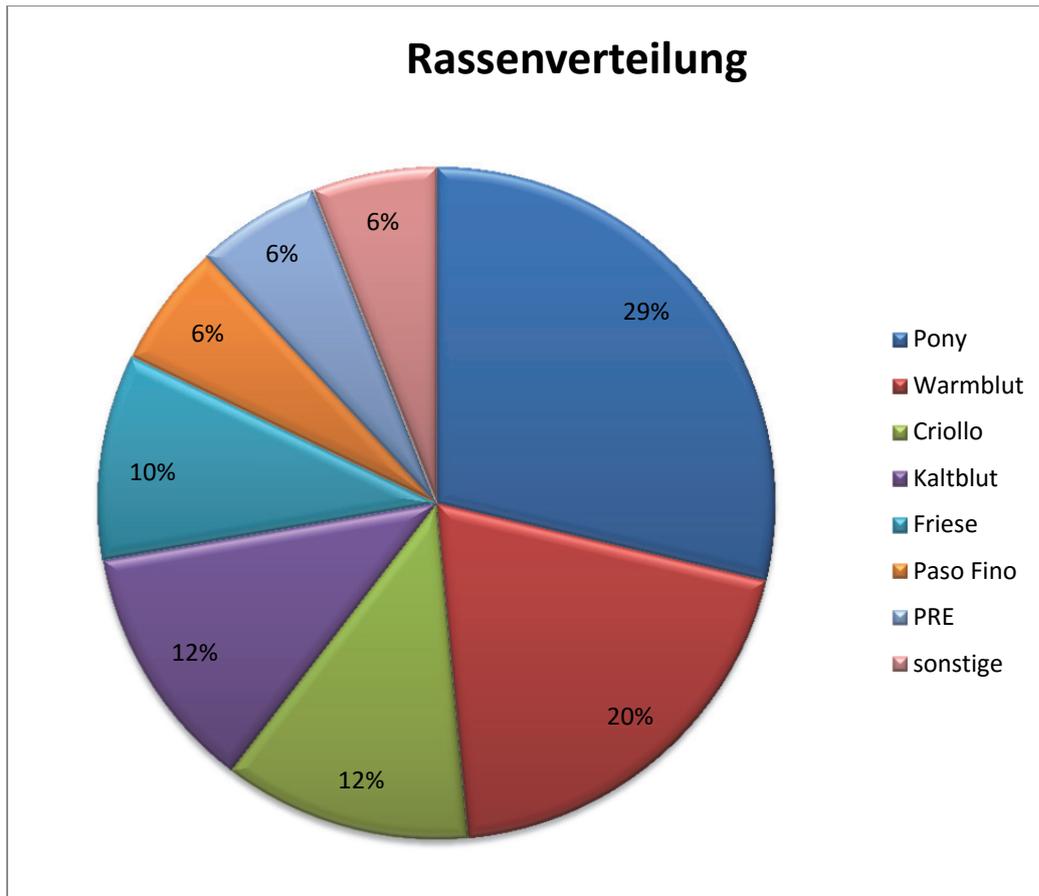
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Anamnesebögen

An der bayernweiten Studie nahmen 51 Pferde unterschiedlichster Rassen teil. Die räumliche Verteilung der Studienpferde und das gesamte Einzugsgebiet zeigt Abbildung 6.



**Abbildung 6:** Räumliche Verteilung der Studienpferde.



**Abbildung 7:** Rassenverteilung der Studienpferde.

Die am häufigsten vertretene Rasse mit 29 Prozent waren die Ponys ( $n=15$ ), gefolgt von den Warmblütern (20%;  $n=10$ ) und den Criollos (12%;  $n=6$ ) (Abbildung 7). Es waren je ein Tinker, ein Arabo-Frieze und ein Traber-Mix vertreten, die unter dem Punkt „sonstige“ zusammengefasst wurden (Abbildung 7).

Knapp 80 Prozent der Pferde waren seit mehr als zwei Jahren im Besitz. Dies war wichtig, um Informationen/Vergleichsmöglichkeiten der Ekzemausprägung der letzten Jahre zu bekommen.

Die Einteilung der Gesamtgruppe in Jung- bzw. Altekzemer (maximal zwei Jahre Symptome bzw. über zwei Jahren Symptome) war im Verhältnis 2/3 Altekzemer (66,6%) zu 1/3 Jungekzemer (33,3%).

Die Besitzer wurden außerdem zu dem Entwurmungsregime ihrer Pferde befragt. Alle teilnehmenden Pferde wurden laut Besitzerangaben regelmäßig (mindestens einmal pro Jahr) entwurmt. Die meisten Pferde (45%) wurden dreimal jährlich entwurmt.

Genau ein Drittel der Patientenbesitzer entwurmten ihre Pferde zweimal im Jahr, 14 Prozent gaben an ihre Pferde viermal jährlich zu entwurmen und acht Prozent entwurmt lediglich einmal pro Jahr.

Bis auf zwei Pferde hatten alle Tiere bereits diverse Therapieversuche hinter sich. Hierbei wurden am häufigsten Cremes/Lotionen (78%) sowie Ekzemerdecken (73%) verwendet. Auch homöopathische Mittel wurden von mehr als der Hälfte der Teilnehmer (55%) bereits getestet. 20 Prozent der Pferde wurden in der Vergangenheit mit cortisonhaltigen Präparaten/Injektionen behandelt. Die höchste Besitzerzufriedenheit zur Milderung der Symptome hatte die Ekzemerdecke.

Die Ausprägung des Ekzems -den Schweregrad der Erkrankung- bei ihren Pferden beurteilten die Besitzer vor Beginn der Studie wie folgt: 12 Prozent fanden die Ausprägung bei ihrem Pferd geringgradig, 45 Prozent stufen den Zustand als mittelgradig und 43 Prozent als hochgradig ein. Alle Pferde zeigten laut Besitzer Juckreiz. Dieser wurde von ihnen auch als schwerwiegendstes und häufigstes Symptom eingeschätzt. Fast 60 Prozent beurteilten den Krankheitszustand ihrer Pferde als schmerzhaft. Die weitere Ausprägung des Ekzems, beurteilt durch die Pferdebesitzer, sind Tabelle 2 zu entnehmen.

**Tabelle 2:** Ausprägung des SE beurteilt durch die Besitzer im Rahmen des Auswahlfragebogens.

<u>Ausprägung (%)</u>	<u>keine</u>	<u>geringgradig</u>	<u>mittelgradig</u>	<u>hochgradig</u>
Juckreiz	0	0	18	82
haarlose Stellen	10	18	41	31
Schuppen	18	18	51	14
blutige Krusten	24	14	39	24
Hautverdickung	24	22	31	24
Schmerzen	41	14	27	18

Die stärkste Ausprägung der Symptome war bei 40 Prozent der Pferde im Frühjahr, 70 Prozent der Tiere zeigten die deutlichsten Symptome im Sommer und 55 Prozent der

Pferde im Herbst. Aufgrund von jahreszeitlich übergreifender Ausprägung bei einigen Pferden wurden Mehrfachnennungen berücksichtigt.

## 4.2 Untersuchungen

### 4.2.1 Allgemeinuntersuchung

Beim Erstbesuch der Pferde wurde vor der Impfung eine Allgemeinuntersuchung durchgeführt, um den aktuellen Gesundheitsstatus der Pferde zu ermitteln. Die Allgemeinuntersuchung war bei allen Pferden o.b.B.

Die durchschnittliche Herzfrequenz lag bei  $37 \pm 9$  Schlägen/Minute, die mittlere Atemfrequenz bei  $13 \pm 5$  Atemzügen/Minute. Keines der Pferde zeigte eine erhöhte innere Körpertemperatur ( $\bar{\emptyset} 37,5 \text{ °C} \pm 0,32 \text{ °C}$ ). Bei der Untersuchung der Schleimhäute zeigten 13 Pferde eine ggr. Rötung der Lidbindehäute, fünf Pferde eine mgr. Rötung. Die Maulschleimhaut war bei sechs Pferden ggr. gerötet. Bei zwei Pferden lag die Kapillarfüllzeit bei drei Sekunden, bei allen anderen war sie kleiner oder gleich zwei Sekunden. Die Hautelastizität war bei allen bis auf ein Pferd erhalten. Dieses zeigte eine leichte Verminderung der Hautelastizität. Der Ernährungszustand war bei 11 Pferden „sehr gut“, bei einem Pferd „mäßig“ und bei zwei Pferden „schlecht“. Bei allen anderen Pferden war der Ernährungszustand als „gut“ zu bezeichnen. Das mittlere Gewicht der Pferde betrug  $483 \text{ kg} \pm 156 \text{ kg}$ . Zehn der 51 Pferde lagen mit Ihrem Gewicht unter 400 kg und bekamen die niedrigere Dosierung von ID.

### 4.2.2 Sommerekzemscore

#### 4.2.2.1 Ergebnisse der Score-Untersuchung

Die Beurteilung der Pferde mittels Sommerekzem-Score-Systems erfolgte dreimal (Erst-, Zwischen-, und Abschlussuntersuchung). Bei der Erstuntersuchung (EU) nahmen alle 51 ausgewählten Pferde teil, wohingegen es bei der Zwischenuntersuchung (ZU) 48 und bei der Abschlussuntersuchung (AU) 43 Pferde waren. Pferd Nr. 1 fehlte aufgrund von Verleih an einen Reitbetrieb bei der Zwischenuntersuchung im Sommer, war aber im Herbst wieder dabei, die anderen Pferde schieden aufgrund von Tod (Nr. 10, 21, 27, 40) oder Verkauf (Nr. 7, 41, 50) zu verschiedenen Zeitpunkten aus der Studie aus. Bei der Erstuntersuchung (EU) im Februar zeigten vier Pferde (Nr. 3, 12, 36, 47) keine Symptome bzw. Veränderungen.

Bei den zwei Folgeuntersuchungen zeigten alle Pferde klinische Symptome des Sommerexzems. Die durchschnittliche Punktezahle je Pferd betrug bei der EU 12,6 Punkte  $\pm$  9,8 Punkte, bei der ZU 37,0 Punkte  $\pm$  28,0 Punkte und bei 28,0 Punkte  $\pm$  18,9 Punkte im Herbst bei der Abschlussuntersuchung. Betrachtet man die Symptome, war der Haarbruch mit einer Summe von 1468 Punkten (17,1% der Gesamtpunktmenge) das am häufigsten und am ausgeprägtesten vorkommende Symptom. Dies spiegelte sich auch in den einzelnen Untersuchungszeitpunkten wieder. Auch hier lag der Haarbruch sowohl bei der Erst-, als auch bei der Zwischen- und der Abschlussuntersuchung jeweils an erster Stelle (EU 260 Punkte, ZU 645 Punkte, AU 563 Punkte). Das zweithäufigste Symptom war mit 714 Punkten die Hautverdickung (siehe Tabelle 3; Abbildung 8), gefolgt von den Schuppen an dritter Stelle (587 Punkte). Die niedrigsten Punktezahlen wiesen die Symptome Alopecie (481 Punkte) und blutig/eitrige Hautveränderungen (375 Punkte) auf. Bei allen Symptomen, mit Ausnahme der Schuppen (Abbildung 9), lagen die Höchstpunktzahlen bei der ZU, wohingegen die niedrigsten Summen bei der EU erreicht wurden. Bei dem Symptom „Schuppen“ war die Verteilung genau umgekehrt. Hier wurde das niedrigste Ergebnis bei der Untersuchung im Sommer erreicht (120 Punkte) und das höchste Ergebnis bei der Erstuntersuchung im Winter (251 Punkte). Keines der Pferde zeigte zum Zeitpunkt der EU blutige oder eitrige Hautveränderungen.

**Tabelle 3:** Punkteverteilung der Symptome.

<u>Symptom</u>	<u>Punkte EU</u> (51 Pferde)	<u>Punkte ZU</u> (48 Pferde)	<u>Punkte AU</u> (43 Pferde)	<u>Gesamt</u>
Haarbruch	260	645	563	1468
Alopecie	15	381	84	481
Blutig/eitrige Hautveränderungen	0	295	80	375
Hautverdickung	117	338	259	714
Schuppen	251	120	216	587

EU Erstuntersuchung  
 ZU Zwischenuntersuchung  
 AU Abschlussuntersuchung



**Abbildung 8:** Pferd Nr. 19: Stark befallener Hals mit starkem Haarbruch, deutlicher Alopezie und Hautverdickung (Elefantenhaut).



**Abbildung 9:** Pferd Nr. 24: Hochgradige Schuppenbildung Hals letztes Drittel.

Die am stärksten befallene Region im Gesamtdurchschnitt aller drei Untersuchungen war der Hals (Durchschnittspunktzahl aller drei Halspartien 648 Punkte), gefolgt vom Schweif (504 Punkte) und der Bauchnaht (322 Punkte). Auch bei den Einzeluntersuchungen hatten diese Regionen die höchsten Punktzahlen. Bei der Untersuchung im Sommer zeigten außerdem der Kopf (158 Punkte) und die Vorderbrust (154 Punkte) starke Symptome. Die genauen Werte aller Regionen sind aus Tabelle 4 zu entnehmen.

**Tabelle 4:** Punkteverteilung der Regionen zu den drei Untersuchungszeitpunkten.

<u>Region</u>	<u>Punkte EU</u> (51 Pferde)	<u>Punkte ZU</u> (48 Pferde)	<u>Punkte AU</u> (43 Pferde)	<u>Gesamt</u>
Kopf	12	158	60	230
Schopf	19	45	58	122
Hals 1/3	151	223	211	585
Hals 2/3	147	284	230	661
Hals 3/3	145	277	275	697
Vorderbrust	3	154	36	193
Brust-WS	7	40	7	54
Lenden-WS/ Kruppe	11	40	17	68
Hinterhand caudal	12	67	44	123
Schweif	87	244	173	504
Bauchnaht	39	192	91	322
Schenkelspalt HE	7	55	7	69

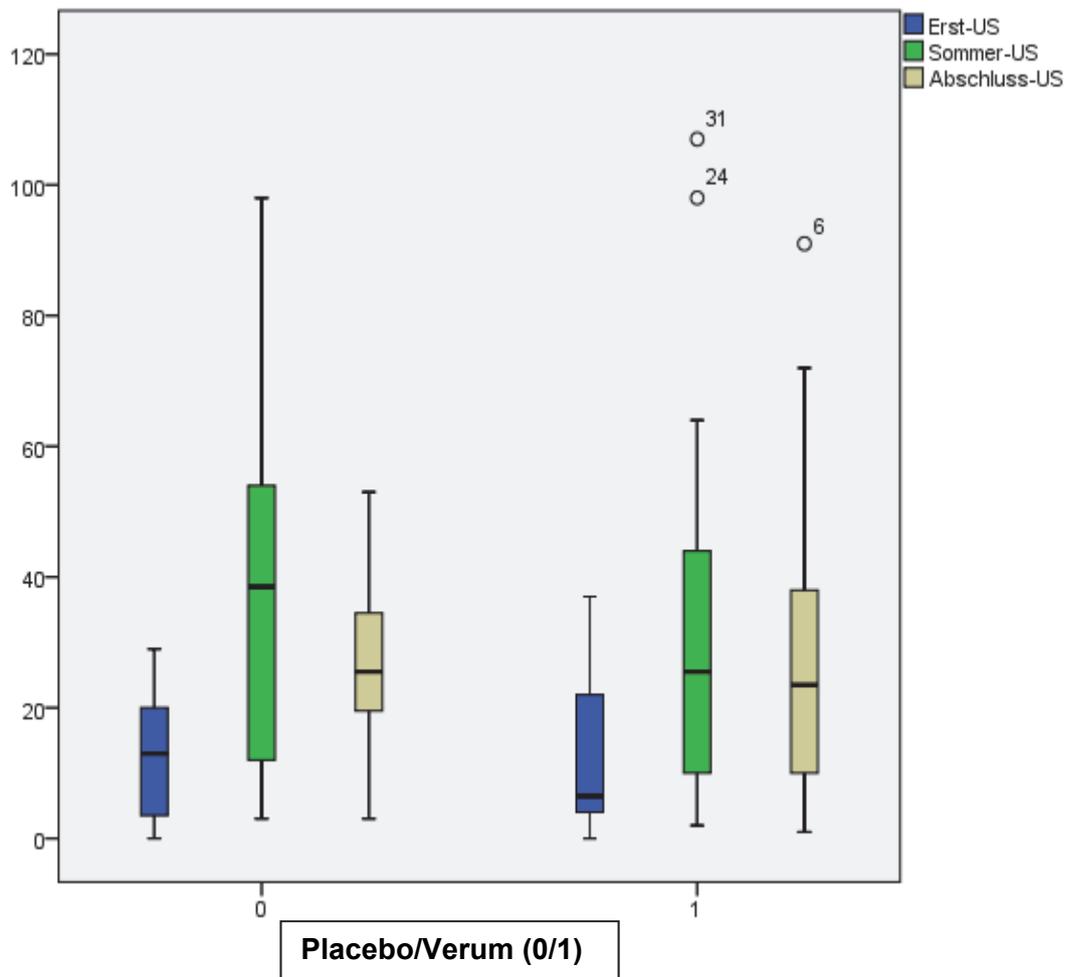
EU Erstuntersuchung  
 ZU Zwischenuntersuchung  
 AU Abschlussuntersuchung  
 WS Wirbelsäule  
 HE Hinterextremität

#### 4.2.2.2 Einfluss von Insol® Dermatophyton auf die klinische Ausprägung

Im Folgenden wurde nun die, durch das Score-System ermittelte, klinische Ausprägung des Sommerekzems zu den drei Untersuchungszeitpunkten in den beiden Gruppen verglichen.

Bei der Erstuntersuchung war die Verteilung Verum zu Placebo 27 zu 24 Pferden. Es bestand zu diesem Zeitpunkt kein signifikanter Unterschied zwischen der Punkteverteilung und der Noten der beiden Gruppen. Es konnte daher von zwei nahezu gleichen Ausgangsgruppen ausgegangen werden.

Vergleicht man den Schweregrad der drei Untersuchungszeitpunkte (Abbildung 10) miteinander, ließ sich in beiden Gruppen ein hochsignifikanter Unterschied ( $p < 0,001$ ) beim Vergleich Winter zu Sommer und Winter zu Herbst feststellen. Hierbei war der Score bei der EU (Winter) signifikant niedriger als bei der ZU (Sommer) und der AU (Herbst). Beim Vergleich Sommer zu Herbst erhielt man in der Placebogruppe ein signifikantes Ergebnis ( $p < 0,037$ ), der Vergleich in der Verumgruppe war nicht signifikant. Vergleicht man nun die beiden Gruppen miteinander, so erhielt man zu keinem Untersuchungszeitpunkt ein signifikantes Ergebnis. Beide Gruppen waren bei der Erst- und der Abschlussuntersuchung so gut wie identisch. Bei der Zwischenuntersuchung im Sommer zeigte sich, dass die mit ID geimpften Tiere einen niedrigeren Score hatten als die Placebotiere. Dieser war nicht signifikant, ließ aber den Trend erkennen, dass sich die Stärke der Symptome der Pferde im Sommer an das Herbstniveau anpasste (Abbildung 10).



**Abbildung 10:** Graphische Darstellung der Score-Entwicklung der beiden Untersuchungsgruppen zu den drei Untersuchungszeitpunkten.

Bei der Zuordnung der „matched-pairs“ ergaben sich 20 passende Pärchen, die sich bei der Erstuntersuchung weder in der Anzahl der Punkte noch in der Note relevant unterschieden. Der Vergleich der „matched-pairs“ bei der Zwischen- und der Abschlussuntersuchung ergab auch hier keinen signifikanten Unterschied der beiden Gruppen. Bei der ZU zeigten sieben Pferde aus der Verumgruppe ein besseres Ergebnis als die Paare aus der Placebogruppe und elf mal war es umgekehrt, dass die Placebogruppe einen besseren (d.h. kleineren Score) hatte als die Verumgruppe. Bei der AU war das Ergebnis mit acht zu sieben gleich verteilt (Tabelle 5).

**Tabelle 5:** Vergleich der Untersuchungszeitpunkte zwischen den „matched-pairs“.

<u>n Score</u>	<u>Erst-US</u>	<u>Zwischen-US</u>	<u>Abschluss-US</u>
V besser P	4	7	8
P besser V	6	11	7
gleich	10	0	0
<u>n Note</u>			
V besser P	6	6	5
P besser V	7	8	6
gleich	7	4	4
<b>Gesamt</b>	20	18	15

US Untersuchung V Verum P Placebo

V besser P = n Verumpferde zeigten weniger Symptome als ihr Partnertier aus der Placebogruppe zum selben Untersuchungszeitpunkt

P besser V = n Placebopferde zeigten weniger Symptome als ihr Partnertier aus der Verumgruppe zum selben Untersuchungszeitpunkt

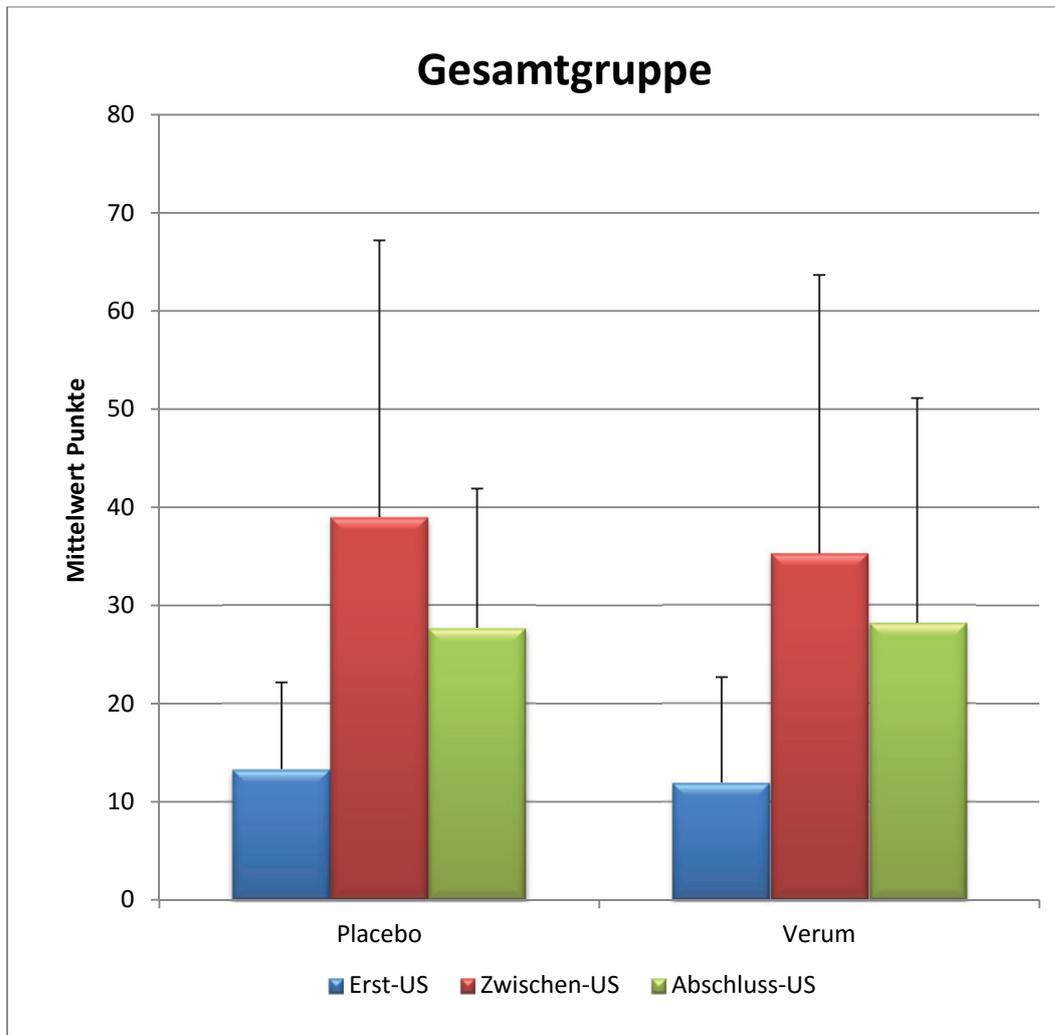
gleich = n Partnertiere zeigten den gleichen Schweregrad der Erkrankung zum selben Untersuchungszeitpunkt

Ebenso war es mit den Score-Mittelwerten der beiden Gruppen bzw. Pärchen zu den drei Untersuchungszeitpunkten (Tabelle 6; Abbildung 11; Abbildung 12). Auch diese lagen in beiden Gruppen zu allen Zeiten in derselben Größenordnung. Es konnte daher kein Unterschied zwischen den behandelten und den nicht behandelten Tiere dargestellt werden.

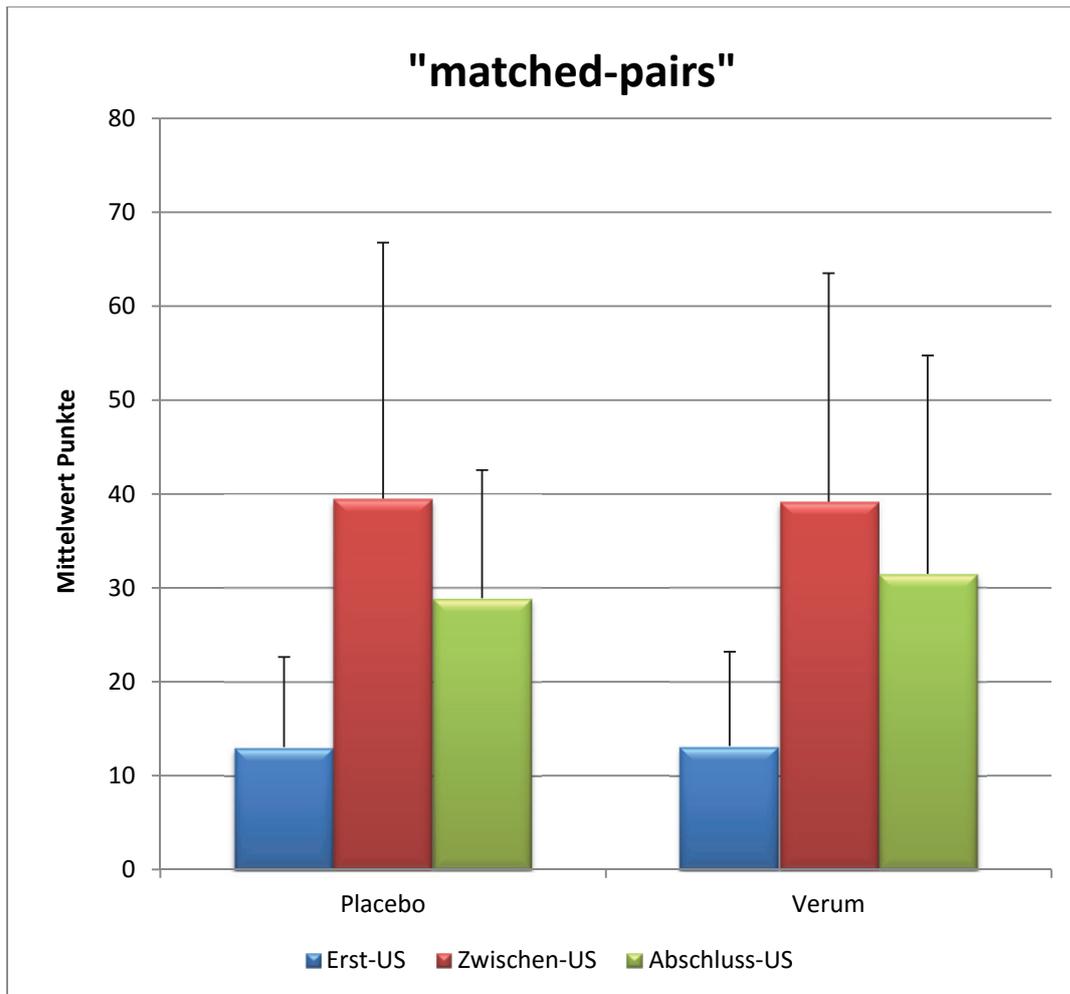
**Tabelle 6:** Vergleich von Mittelwert und Standardabweichung der Scores in der Gesamtgruppe und den „matched-pairs“ zu den Untersuchungszeitpunkten.

<u>Gesamtgruppe</u>		<u>n</u>	<u>Mittelwert</u>	<u>Standardabweichung</u>
Erst- US	Placebo	24	13,33	8,83
	Verum	27	11,96	10,73
Zwischen- US	Placebo	23	39,00	28,20
	Verum	25	35,28	28,39
Abschluss- US	Placebo	21	27,71	14,20
	Verum	22	28,23	22,89
<u>„matched-pairs“</u>				
Erst- US	Placebo	20	13,05	9,58
	Verum	20	13,15	10,04
Zwischen - US	Placebo	18	39,50	27,28
	Verum	18	39,17	24,35
Abschluss- US	Placebo	18	28,89	13,65
	Verum	18	31,50	23,25

US Untersuchung  
n Anzahl



**Abbildung 11:** Graphische Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung der Scores zwischen Verum und Placebo in der Gesamtgruppe zu den Untersuchungszeitpunkten (US Untersuchung).



**Abbildung 12:** Graphische Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung der Scores zwischen Verum und Placebo der „matched-pairs“ zu den Untersuchungszeitpunkten (US Untersuchung).

Die Verumgruppe wurde außerdem, nach Entblindung der Studie, noch in Jung- (n=11) und Altekzemer (n=16) unterteilt, da aus Erfahrungsberichten hervorging, dass Tiere mit max. zwei Jahren Symptomen besser auf die Therapie mit ID ansprachen als Pferde mit bereits länger bestehender Symptomatik. Vergleicht man die Scores dieser zwei Gruppen zu den drei Untersuchungszeitpunkten, so war der Unterschied bei der Erstuntersuchung signifikant ( $p=0,022$ ), wobei die Jungekezemer den signifikant niedrigeren Mittelwert ( $6,9 \pm 5,4$ ) im Vergleich zu den Altekzemern ( $15,4 \pm 12,2$ ) hatten. Bei den Untersuchungen im Sommer (Jungekezemer  $23,2 \pm 18,3$ / Altekzemer  $42,1 \pm 31,2$ ) und Herbst (Jungekezemer  $17,14 \pm 12,1$ / Altekzemer  $34,6 \pm 25,5$ ) war, aufgrund der niedrigen Tierzahl, kein signifikanter Unterschied darstellbar, allerdings waren deutliche Unterschiede zwischen den beiden Gruppen zu erkennen. Auch hier hatten

die Jungekezemer den niedrigeren Mittelwert. Beim Vergleich der Gesamtnoten der Jung ( $1,0 \pm 0,8$ ) - und Altekzemergruppe ( $1,8 \pm 1,3$ ) war bei der Erstuntersuchung kein signifikanter Unterschied nachweisbar, jedoch sowohl beim Vergleich der Werte der Zwischen- (Jungekezemer  $1,7 \pm 1,3$ / Altekzemer  $2,9 \pm 1,5$ ) als auch bei der Abschlussuntersuchung (Jungekezemer  $1,8 \pm 1,3$ / Altekzemer  $2,9 \pm 1,2$ ), wobei auch hier die Jungekezemer den niedrigeren und somit besseren Score zeigten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass wie bei der Erkrankung „Sommerkekzem“ zu erwarten war, die höchsten Punktezahlen bei der Zwischenuntersuchung im Sommer erreicht wurden, die niedrigsten bei der Erstuntersuchung Anfang des Jahres. Als weiteres Ergebnis wurde herausgefunden, dass durch den Schweregrad bei der Erstuntersuchung im Februar auf die Schwere der Krankheit im weiteren Verlauf geschlossen werden kann. So korrelierten hierbei die im Score vergebenen Noten zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten hochsignifikant ( $p < 0,01$ ) (Anhang 9.4 und 9.5). Alle Pferde mit einem hohen Score im Winter hatten auch einen hohen Score im Sommer und Herbst.

Als drittes Ergebnis lässt sich festhalten, dass die mit ID geimpften Jungekezemer im Vergleich zu Altekzemern deutlich weniger reagierten und daher einen niedrigeren Punktescore bzw. eine niedrigere Gesamtnote aufwiesen.

Der therapeutische bzw. prophylaktische Einsatz von ID vor Beginn der Insektenperiode brachte bei Einzeltieren eine Verbesserung der klinischen Ausprägung (z.B. Pferd Nr. 13) bzw. verlagerte den Ausbruch des SE nach hinten (z.B. Pferd Nr. 38). Beides war nicht signifikant nachweisbar und bei den Einzeltieren sehr individuell gestaltet und nur in Nuancen erkennbar. Im Vergleich der beiden Gruppen bzw. der Gesamtgruppe kam es durch die Medikation weder zu einer Besserung noch zu einer Verschlechterung der Sommerkekzem-Symptomatik.

#### 4.2.3 Ergebnisse der Blut-Untersuchungen

##### 4.2.3.1 Funktioneller *in-vitro* Test (FIT)

###### 4.2.3.1.1 FIT I

Bei der Blutentnahme für den ersten FIT (FIT I) im Februar/März 2011 nahmen alle 51 ausgewählten Pferde teil. Drei der eingeschickten Blutproben wurden vom Labor als

nicht auswertbar eingestuft (Nr. 3, 9, 23). Zwei Pferde zeigten keine Reaktionsbereitschaft auf die getesteten Insekten (Nr. 26, 41).

Die Einteilung der Schweregrade des FIT erfolgte von 0 (= keine Reaktion) bis 4 (= hgr. Reaktion). Getestet wurden acht Insektenallergene. Das ergab eine maximale Punktzahl von 32 Punkten je Pferd, welche man durch Multiplikation erhält (4 Reaktionsstufen x 8 Insekten = 32 Punkte).

Mit 81,3 Prozent (39/48) reagierten die meisten Tiere auf die Motte, ein als in erster Linie nicht Sommerexzem relevantes Insekt. Erst an zweiter Stelle fand sich die Gnitze mit 72,9 Prozent (35/48) gefolgt von der Stechmücke mit 62,5 Prozent (30/48) (Tabelle 7). Die Anzahl der Insekten auf die die einzelnen Tiere reagierten, sind aus Tabelle 8 zu entnehmen. So reagierten beim FIT I sieben Tiere auf alle acht und zwei Pferde auf keines der getesteten Insekten. Am häufigsten wurde, mit zehn Pferden, auf drei der getesteten Insekten angesprochen (Tabelle 8).

**Tabelle 7:** Anzahl reagierender Pferde pro Insekt beim FIT I.

<u>FIT I</u> (48 Ergebnisse)	<u>Gnitze</u>	<u>Waden- stecher</u>	<u>KBM</u>	<u>ETF</u>	<u>Motte</u>	<u>Stech- mücke</u>	<u>Pferde- bremse</u>	<u>Haus- fliege</u>
reagierende Pferde	35	22	21	28	39	30	21	13
Prozent	72,9	45,8	43,8	58,3	81,3	62,5	43,8	27,1

KBM Kriebelmücke

ETF Eintagsfliege

**Tabelle 8:** Anzahl der reagierenden Tiere auf die acht Insekten.

<u>Anzahl Insekten</u>	<u>Anzahl reagierender Pferde</u>
8	7
7	7
6	6
5	3
4	3
3	10
2	7
1	3
0	2

Die durchschnittliche Punktezahl lag bei 7,5 Punkten  $\pm$  5,3 Punkten, die durchschnittliche Anzahl an Insekten auf die ein Pferd reagierte bei 4,5 Insekten  $\pm$  2,5 Insekten.

#### 4.2.3.1.2 FIT II

Bei der Blutuntersuchung für den FIT II, die im Rahmen der Abschlussuntersuchung im Herbst durchgeführt wurde, nahmen noch 43 Pferde der ursprünglich 51 Studienpferde teil. Hier war ein Pferd nicht auswertbar (Nr. 47) bzw. zeigte keine ausreichende Reaktionsbereitschaft (Nr. 16).

Im Rahmen dieses Testes lag die Stechmücke mit 38 von 42 reagierenden Pferden mit 90,5 Prozent an erster Stelle, gefolgt von der Gnitze (29/42) und der Motte (25/42). Die weiteren Ergebnisse sind aus Tabelle 9 zu entnehmen.

**Tabelle 9:** Anzahl reagierender Pferde pro Insekt beim FIT II.

<u>FIT II</u> (42 Ergebnisse)	<u>Gnitze</u>	<u>Waden- stecher</u>	<u>KBM</u>	<u>ETF</u>	<u>Motte</u>	<u>Stech- mücke</u>	<u>Pferde- bremse</u>	<u>Haus- fliege</u>
<b>reagierende Pferde</b>	29	13	7	8	25	38	15	14
<b>Prozent</b>	69	31	16,7	19	59,5	90,5	35,7	33,3

KBM Kriebelmücke  
ETF Eintagsfliege

Im FIT II reagierten die meisten Pferde (11/43) auf zwei der acht getesteten Insekten. Je vier Pferde reagierten auf alle acht bzw. auf sieben der untersuchten Allergene. Fünf Pferde reagierten auf sechs Insekten, drei auf je fünf der acht getesteten Insekten. Jeweils sechs Tiere reagierten auf drei bzw. vier der untersuchten Spezies und zwei Pferde reagierten auf nur ein Insekt positiv.

Die durchschnittliche Anzahl der Insekten, auf die ein Pferd reagierte, lag bei 4,1 Insekten  $\pm$  2,2 Insekten. Die durchschnittliche Punkteanzahl bei 5,6 Punkten  $\pm$  3,8 Punkten. So lagen bei der Untersuchung im Herbst sowohl die Punkteanzahl als auch die Anzahl der Insekten, auf die die Pferde reagierten, unter dem Wert der Erstuntersuchung.

#### 4.2.3.1.3 FIT I und II im Vergleich

Beim Vergleich der beiden FITs lag von 39 Pferden je ein auswertbares Ergebnis beider Untersuchungen vor. Diese teilten sich in 21 Verum- und 18 Placebotiere auf. Pro Untersuchungszeitpunkt war hier je ein Pferd falsch negativ, wobei dieses beim FIT I aus der Placebogruppe, beim FIT II aus der Verumgruppe stammte. Betrachtet man die Anzahl der Pferde, die eine Reaktion auf die getesteten Insekten zeigten, so fiel auf, dass mit Ausnahme der Stechmücke in beiden Gruppen, sowie der Hausfliege in der Verum- und der Gnitze in der Placebogruppe, deutlich mehr Pferde eine allergische Reaktion im FIT I auf die untersuchten Insekten zeigten, als im FIT II (Tabelle 10). Die häufigsten Bindungen (gleiche Reaktionsstufe in beiden Tests) waren in beiden Gruppen mit 30 Prozent, bei der Stechmücke und in der Placebogruppe zusätzlich noch bei der Gnitze zu finden (Tabelle 10). Bei den Pferden, die in beiden Tests positiv, jedoch mit je einer anderen Reaktionsstufe, auf ein Insekt ansprachen, war ebenfalls die Stechmücke mit 52 Prozent in der Verum- und 72 Prozent in der Placebogruppe das Insekt mit der höchsten Übereinstimmung, gefolgt von der Gnitze (43% Verum, 56% Placebo). In beiden Gruppen gab es einen hohen Anteil an Tieren, die in beiden Tests auf ein Insekt negativ reagierten (Tabelle 10). Tabelle 10 stellt die Reaktionen der beiden Untersuchungsgruppen (Verum und Placebo) zu den beiden Untersuchungszeitpunkten (FIT I und FIT II) gegenüber. Dies soll am Beispiel der Gnitze für die Verumgruppe erläutert werden: In dieser Gruppe reagierten zehn Pferde sowohl im FIT I, als auch im FIT II mit derselben Reaktionsstufe (0 bis 4) auf die Gnitze. Dies wird in der Tabelle als „Bindung“ bezeichnet. Des Weiteren sprachen allgemein 15 Tiere im FIT I („Reaktion I“) und zwölf Tiere im FIT II („Reaktion II“) mit einer allergischen Reaktion auf die Gnitze im Allergietest an. Davon reagierten neun

Pferde in beiden Tests („Reaktion I&II) allergisch auf das Insekt. Vier Pferde zeigten lediglich im FIT I („nur I) und ein Pferd nur im FIT II („nur II“) eine allergische Reaktionsbereitschaft auf die Gnitze. Und fünf Probanden sprachen weder im FIT I noch im FIT II allergisch auf die Gnitze an („beide Null“).

Die durchschnittliche Punktemenge im FIT I war mit 8,35 Punkten  $\pm$  5,5 Punkten signifikant ( $p = 0,038$ ) höher als beim FIT II mit 5,45 Punkten  $\pm$  3,5 Punkten. Dies spiegelte sich auch bei der Betrachtung der Einzelinsekten wieder. Hierbei waren die Reaktionen auf die Gnitze, die Kriebelmücke, die Eintagsfliege, die Motte sowie die Pferdebremse im FIT I signifikant höher als im FIT II.

**Tabelle 10:** Vergleich der Reaktionslage der Pferde zu beiden Testzeitpunkten im FIT.

<u>Verum</u> (n=21)	<u>Bindung</u>	<u>Reaktion</u>	<u>Reaktion</u>	<u>Reaktion</u>	<u>nur</u>	<u>nur</u>	<u>beide</u>
		I	II	I&II	I	II	Null
<b>Gnitze</b>	4	15	12	9	4	1	5
<b>Wadenstecher</b>	2	14	8	5	7	4	4
<b>Kriebelmücke</b>	3	11	5	4	7	1	9
<b>Eintagsfliege</b>	2	14	3	2	11	2	5
<b>Motte</b>	3	17	13	9	7	2	1
<b>Stechmücke</b>	7	12	19	11	1	8	1
<b>Bremse</b>	2	11	7	5	6	2	8
<b>Hausfliege</b>	3	7	9	3	4	6	8
<b>Placebo</b> (n=18)							
<b>Gnitze</b>	6	11	14	10	1	3	2
<b>Wadenstecher</b>	1	7	4	2	5	2	9
<b>Kriebelmücke</b>	0	9	1	1	8	0	9
<b>Eintagsfliege</b>	1	11	2	2	9	0	7
<b>Motte</b>	3	15	11	9	6	2	1
<b>Stechmücke</b>	5	14	16	13	1	3	1
<b>Bremse</b>	0	9	7	5	4	2	7
<b>Hausfliege</b>	0	5	4	1	4	2	10

- Bindung = n Tiere reagieren zu beiden Testzeitpunkten (FIT I & II) mit der gleichen Reaktionsstufe auf das getestete Insekt
- Reaktion I = n Tiere reagieren zum Testzeitpunkt I (FIT I) auf das untersuchte Insekt
- Reaktion II = n Tiere reagieren zum Testzeitpunkt II (FIT II) auf das untersuchte Insekt
- Reaktion I&II = n Tiere reagieren zu beiden Testzeitpunkten (FIT I&II), aber mit unterschiedlichen Reaktionsstufen auf das untersuchte Insekt
- nur I = n Tiere reagieren nur zum Zeitpunkt I (FIT I) auf das untersuchte Insekt
- nur II = n Tiere reagieren nur zum Zeitpunkt II (FIT II) auf das untersuchte Insekt
- beide 0 = n Tiere reagieren zu beiden Testzeitpunkten (FIT I&II) nicht auf das untersuchte Insekt

#### 4.2.3.1.4 FIT I & II und Score im Vergleich

Da, wie bereits beschrieben, der FIT in Schweregrade unterteilt war, wurden diese mit den am gleichen Tag untersuchten klinischen Scores der Pferde verglichen um herauszufinden, ob man aufgrund der Höhe der FIT Ergebnisse auf den Schweregrad der klinischen Ausprägung der Pferde schließen kann. Vergleicht man als erstes die beiden zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführten FIT Allergietests, so ließ sich keine Korrelation der Schweregrade der beiden Testzeitpunkte feststellen. Das heißt, dieselben Pferde reagierten zu den unterschiedlichen Testzeitpunkten im FIT anders. Hingegen korrelierten die Noten der Scores der beiden Testzeitpunkte hochsignifikant. So hatten Tiere mit einem hohen Punktescore bei der Erstuntersuchung auch einen hohen Score bei den Folgeuntersuchungen.

Vergleicht man nun die Note des Scores bei der Erstuntersuchung mit den Ergebnissen des FIT I, so war keine Korrelation der beiden Ergebnisse nachweisbar ( $p=0,207$ ). Das bedeutet im Einzelnen, dass Pferde mit einem hohen FIT Wert nicht zwangsläufig einen hohen Score, sprich klinische Ausprägung des Sommerekzems zeigten. Ebenso vice versa. Auch die beiden Pferde, die ein negatives Testergebnis im FIT I hatten, zeigten bereits zu diesem Zeitpunkt Symptome.

Ebenso verhielt es sich bei der Abschlussuntersuchung. Auch hier war kein Zusammenhang zwischen der Höhe des FIT II und dem Schweregrad, ermittelt durch den klinischen Score, am gleichen Tag nachweisbar. Auch das hier als negativ getestete Pferd (Nr. 16) zeigte deutliche Symptome des Sommerekzems (Abbildung 13).



**Abbildung 13:** Pferd Nr.16 - deutlich geschädigter Schweif in der Regenerationsphase.

Es ließ sich also kein Rückschluss von der Höhe/Reaktionslage des Pferdes beim FIT auf die tatsächliche klinische Ausprägung der Krankheit ziehen.

#### 4.2.3.2 Cellular Antigen Stimulation Test (CAST)

##### 4.2.3.2.1 CAST I

Auch beim CAST I nahmen bei der ersten Untersuchung alle 51 Pferde teil. Zwei der Proben (Nr. 8, 21) waren aufgrund labortechnischer Probleme nicht auswertbar. Beim CAST I zeigten sieben Pferde (14,2%) bei allen getesteten Insekten keine Reaktionsbereitschaft über den vom Labor als Schwellenwert angegebenen 250 pg/ml (Nr. 3, 5, 28, 35, 36, 41, 44). Beim CAST I reagierten die meisten Pferde mit 71,4 Prozent auf die Gnitze (35/49), gefolgt von der Stechmücke mit 61,2 Prozent (30/49), der Kriebelmücke mit 21 Pferden (42,9%) und schließlich der Bremse (19/49; 38,8%) (Tabelle 11).

**Tabelle 11:** Anzahl reagierender Pferde pro Insekt beim CAST I.

<u>CAST I</u>				
(49 Ergebnisse)	<u>Gnitze</u>	<u>Bremse</u>	<u>Kriebelmücke</u>	<u>Stechmücke</u>
reagierende Pferde	35	19	21	30
Prozent	71,4	38,8	42,9	61,2

##### 4.2.3.2.2 CAST II

Im Herbst nahmen beim CAST II, ebenso wie beim FIT II, 43 Pferde an der Untersuchung teil. Hier lieferten alle Proben ein vom Labor auswertbares Ergebnis. Allerdings zeigten nun 30,2 Prozent (13/43) der Pferde bei allen vier getesteten Insekten keine Reaktionsbereitschaft über dem vom Labor festgelegten Schwellenwert (250 pg/ml) und wurden somit vom Labor als „reaktionsfrei“ eingestuft. Im Einzelnen sind dies die Nr. 1, 2, 4, 5, 8, 28, 29, 35, 36, 39, 42, 43 und 44. Dies waren signifikant mehr negative Pferde als beim CAST I ( $p=0,043$ ).

Beim CAST II im Herbst war die Gnitze mit 60,5 Prozent (26/43) ebenfalls das Insekt, auf das die meisten Tiere reagierten. Mit 24 von 43 Pferden und 55,8 Prozent war hier die Bremse das am zweitstärksten vertretene Insekt, gefolgt von der Stechmücke (16/43) und der Kriebelmücke (10/43) (Tabelle 12).

**Tabelle 12:** Anzahl reagierender Pferde pro Insekt beim CAST II.

<u>CAST II</u>				
(43 Ergebnisse)	<u>Gnitze</u>	<u>Bremse</u>	<u>Kriebelmücke</u>	<u>Stechmücke</u>
reagierende Pferde	26	24	10	16
Prozent	60,5	55,8	23,3	37,2

#### 4.2.3.2.3 CAST I und II im Vergleich

Von 42 Pferden lagen je zwei auswertbare CAST Ergebnisse vor. Davon waren 22 Pferde in der Verum- und 20 Tiere in der Placebogruppe. Von diesen Pferden hatten beim CAST I sechs Pferde, beim CAST II elf Pferde ein negatives Testergebnis, wovon vier Tiere zu beiden Untersuchungszeitpunkten ein negatives Ergebnis zeigten. In der Placebogruppe hatten beim CAST I vier Tiere, beim CAST II fünf Pferde ein negatives Ergebnis. In der Verumgruppe waren es beim CAST I zwei Tiere und beim CAST II sieben Tiere (siehe auch Kapitel 4.2.4/Tabelle 15).

Im Folgenden wurde nun die Reaktionsbereitschaft der beiden Gruppen auf die vier getesteten Insekten getrennt untersucht. Hierbei unterschieden sich die beiden Gruppen hinsichtlich der Bindungen – Pferde, die sowohl im CAST I als auch im CAST II auf ein Insekt positiv reagierten – nur bei der Stechmücke. Während in der Verumgruppe zehn Pferde in beiden Tests auf sie ansprachen, waren es in der Placebogruppe lediglich drei Tiere (Tabelle 13). Allgemein lagen in beiden Gruppen maximal bei 50 Prozent der Studienteilnehmer Bindungen (gleiche Reaktion in beiden Tests) vor (11/22 Verum, 10/20 Placebo). Im Weiteren unterschieden sich die beiden Tests in beiden Gruppen vor allem bei der Kriebel- und der Stechmücke (Tabelle 13). Ansonsten war die Anzahl der reagierenden Tiere je Testzeitpunkt und Gruppe annähernd gleich.

**Tabelle 13:** Vergleich der Reaktionen im CAST auf die getesteten Insekten.

<u>Verum</u> (22 Pferde)	<u>Bindung</u>	<u>Reaktionen</u> <u>CAST I</u>	<u>Reaktionen</u> <u>CAST II</u>
Gnitze	11	15	13
Bremse	6	11	12
Kriebelmücke	0	9	4
Stechmücke	10	16	11
<u>Placebo</u> (20 Pferde)			
Gnitze	10	14	12
Bremse	6	8	11
Kriebelmücke	2	10	6
Stechmücke	3	11	4

Bindung = n Tiere reagieren zu beiden Testzeitpunkten (CAST I&II) auf das untersuchte Insekt

Reaktion CAST I = n Tiere reagieren zum Testpunkt I (CAST I) positiv auf das untersuchte Insekt

Reaktion CAST II = n Tiere reagieren zum Testpunkt II (CAST II) positiv auf das untersuchte Insekt

#### 4.2.3.2.4 CAST und klinische Ausprägung

Beim CAST wurde die Reaktionsbereitschaft lediglich mit einem Schwellenwert (>250pg/ml) und nicht in Schweregraden angegeben. Die Höhe des tatsächlichen Wertes korreliert laut Laborbeschreibung nicht zwangsläufig mit der klinischen Ausprägung bzw. dem Schweregrad. Wie bereits beschrieben hatten beim CAST I sieben und beim CAST II 13 Pferde ein negatives Testergebnis. Hiervon waren beim CAST I zwei Pferde in der Verum- und fünf in der Placebogruppe, beim CAST II sieben Pferde in der Verum- und sechs in der Placebogruppe. Vergleicht man nun den Score der negativ getesteten Tiere zu dem jeweiligen Untersuchungszeitpunkt mit den Testergebnissen, so zeigten alle Tiere, bis auf Nr. 28, deutliche Ausprägungen der Sommerkzemsymptomatik. Bei Nr. 28 waren die Symptome so gering, dass die Gesamtnote zu allen drei Untersuchungszeitpunkten Null betrug. Dennoch zeigte auch dieses Pferd leichte klinische Symptome. Bei vier Pferden war die Note bei der Erstuntersuchung, in der allergenfreien Zeit, Null, bei den Folgeuntersuchungen aber mindestens einmal darüber.

Fünf Pferde wurden in beiden Tests als negativ und somit quasi als allergiefrei getestet. Hierbei zeigten die Nr. 28, 35 und 36 nur leichte Symptome, Nr. 5 und 44 aber eine sehr starke klinische Ausprägung des Sommerekzems. So hatte Pferd 44 bei der Zwischenuntersuchung die höchstmögliche Note von 5 (Abbildung 14; Abbildung 15) und auch Pferd 5 (Abbildung 16; Abbildung 17) zeigte zu allen drei Untersuchungszeitpunkten eine starke Ausprägung der Erkrankung.



**Abbildung 14:** Pferd Nr.44 - deutliche Alopezie mit blutigen Krusten am Kopf.



**Abbildung 15:** Pferd Nr.44 Widerrist/Schulter/Hals - deutliche Alopezie mit blutigen Krusten und Hautverdickung.



**Abbildung 16:** Pferd Nr. 5 - deutliche Hautverdickung am Hals mit starkem Haarbruch.



**Abbildung 17:** Pferd Nr. 5 Ansicht von oben - starker Haarbruch der Mähne mit Schuppenbildung, Alopezie und blutigen Krusten.

#### 4.2.3.3 Gegenüberstellung CAST vs. FIT

Bei 37 Pferden lagen auswertbare Ergebnisse aller vier Tests (FIT I&II, CAST I&II) vor. Von diesen 37 Pferden waren 18 in der Verum- und 19 in der Placebogruppe. Vergleicht man die Häufigkeit der in beiden Tests untersuchten Insektenallergene (Gnitze, Stechmücke, Bremse, Kriebelmücke), so deckten sich die Ergebnisse bei der EU im Winter sowohl in der Reihung der am häufigsten/wenigsten häufig vorkommenden Insekten, als auch in der Anzahl positiver Reaktionen pro Insekt beinahe zu 100% (Abbildung 18). Im Herbst ließ sich jedoch sowohl in der Reihung der Häufigkeit als auch in der Anzahl der reagierenden Tiere teilweise ein deutlicher Unterschied feststellen. Hier stand beim FIT II die Stechmücke mit 33 reagierenden Pferden an erster Stelle, während auf sie im CAST II nur 13 Tiere reagierten. Die Anzahl der auf die Gnitze allergisch reagierenden Tiere war dennoch fast deckungsgleich (25/23) ebenso wie die Reaktionen auf die Kriebelmücke. Auf diese reagierten alle Pferde in allen vier Tests am wenigsten. Die Reihung und Anzahl der reagierenden Pferde je Insekt ist aus Tabelle 14 zu entnehmen.

**Tabelle 14:** Reihung der Insektenhäufigkeit bei allen vier Tests.

<u>37 Pferde</u>	<u>FIT I</u>	<u>CAST I</u>	<u>FIT II</u>	<u>CAST II</u>
<b>Häufigkeit 1</b>	Gnitze n=27	Gnitze n=26	SM n=33	Gnitze n=23
<b>Häufigkeit 2</b>	SM n=25	SM n=24	Gnitze n= 25	Bremse n=21
<b>Häufigkeit 3</b>	Bremse n=19	Bremse n=17	Bremse n=14	SM n=13
<b>Häufigkeit 4</b>	KM n=18	KM n=16	KM n= 6	KM n= 8

SM Stechmücke

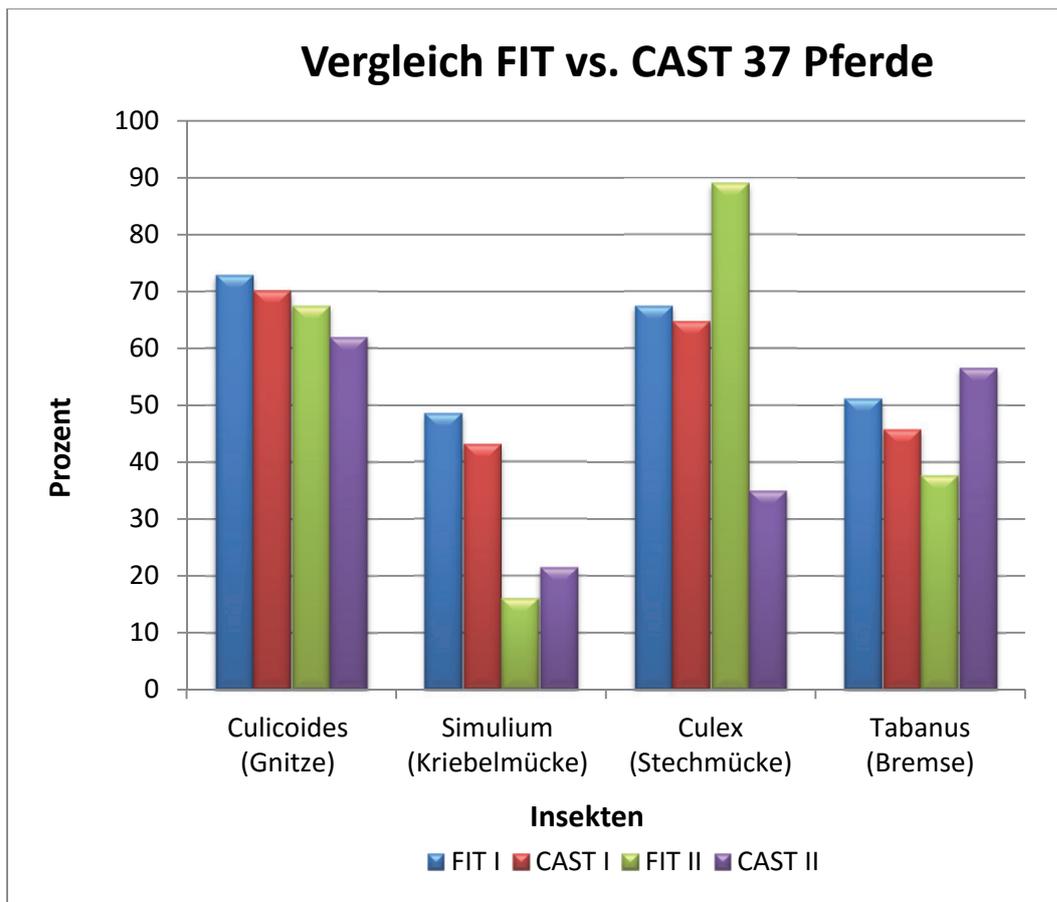
KM Kriebelmücke

Häufigkeit 1 = das Insekt auf das am häufigsten reagiert wurde

Häufigkeit 2 = das Insekt auf das am zweithäufigsten reagiert wurde

Häufigkeit 3 = das Insekt auf das am dritthäufigsten reagiert wurde

Häufigkeit 4 = das Insekt auf das am vierthäufigsten reagiert wurde



**Abbildung 18:** Graphische Darstellung der Insektenhäufigkeiten bei FIT und CAST im Vergleich.

Beim Vergleich der 37 Pferde mit je vier auswertbaren Testergebnissen waren im FIT je ein Pferd bei der Erstuntersuchung (Nr. 26) und bei der Abschlussuntersuchung (Nr. 16) negativ. Beim CAST waren es bei der EU 4 (Nr. 5, 35, 36, 44) bei der AU sogar elf Pferde (Nr. 1, 2, 4, 5, 29, 35, 36, 39, 42, 43, 44) (Tabelle 15). Dieser Unterschied der beiden Tests war bei der AU hochsignifikant ( $p=0,00153$ ). Im Winter bei der EU war dies ebenfalls deutlich, aber nicht signifikant sichtbar. Im CAST zeigten vier der 37 Pferde zu beiden Untersuchungszeitpunkten einen negativen Test (Nr. 5, 35, 35, 44). Beim FIT war kein Pferd in beiden Tests negativ.

Reduzierte man die im FIT getesteten Insekten auf die im CAST getesteten (Gnitze, Kriebelmücke, Stechmücke, Bremse), so änderte sich das Ergebnis deutlich. Nun waren im FIT I sechs (Nr. 14, 16, 25, 26, 34, 36) im FIT II zwei Pferde (16, 43) negativ.

In der Gesamtgruppe waren es im FIT I sieben Pferde, im FIT II zwei Pferde, sowie sieben Pferde im CAST I und 13 im CAST II, die ein falsch negatives Ergebnis zeigten.

Da alle getesteten Pferde bereits mindestens eine Saison deutliche Anzeichen von SE zeigten und auch kein Pferd in allen vier Tests negativ war, lässt sich hier von falsch negativen Pferden sprechen. Hier schnitt der FIT als besserer und verlässlicherer Test ab, da er deutlich weniger falsch negative (FIT I n = 2, FIT II n = 1) Pferde beinhaltete als der CAST (CAST I n = 7, CAST n II = 13).

#### 4.2.3.4 Zytokinbestimmung

Insgesamt wurden im Rahmen der Zytokinauswertung 244 Blutproben ausgewertet (je 51 bei den ersten drei Besuchen, 48 bei der Zwischenuntersuchung und 43 bei der Abschlussuntersuchung).

Bei der Auswertung fiel auf, dass bei 23 Pferden (13 Verum, 10 Placebo) unabhängig vom Untersuchungszeitpunkt insgesamt 258 Werte über dem höchsten Standardwert lagen und somit ohne Verdünnung nicht auswertbar waren. Mit Abstand die meisten zu hohen Werte lieferte IL-4 mit 92 primär nicht auswertbaren Ergebnissen, gefolgt von TNF $\alpha$  mit 68, IL-10 mit 61, IFN $\gamma$  mit 36 und IL-1 mit einem nicht auswertbaren Wert. Alle 23 Pferde hatten mindestens einen IL-4 Wert zu hoch.

Die Proben wurden im Anschluss der Auswertung der Nativproben verdünnt und schließlich rückgerechnet. Mit dieser Methode war es nicht möglich in einer sinnvollen Größenordnung zum Standard liegende Werte zu gewinnen. Diese waren teilweise auch nicht replizierbar. So erhielt man bei stichprobenartig durchgeführten Doppelkontrollen bzw. bei zwei im Nachweisbereich liegenden Verdünnungsstufen zum Teil sehr unterschiedliche Ergebnisse. So lag der errechnete Wert bei Pferd Nummer 50 bei IL-4/I (erste Blutabnahme) bei der Verdünnungsstufe 1:500 bei 280195,5 pg/ml bei der Verdünnungsstufe 1:1000 bei 148296 pg/ml. Der zugrunde liegende Standard lag in der höchsten Konzentration für IL-4 bei 2000 pg/ml.

Um die Ergebnisse trotzdem verwenden und mit ihnen arbeiten zu können, wurde letztendlich für jeden Wert oberhalb der Nachweisgrenze ein fiktiver Wert festgelegt und durch diesen ersetzt. Dieser lag, je nach Grundkonzentration, bei IL-4 und TNF $\alpha$  bei 2500 pg/ml (höchste Nachweisgrenze bei 2000 pg/ml), bei IL-10 bei 25000 pg/ml (Nachweisgrenze bei 20000) und bei IFN $\gamma$  bei 5000 pg/ml (4000 pg/ml als höchster Messwert).

## 4.2.3.4.1 Interleukin 1

Bei den Mittelwerten und Standardabweichungen der IL-1 Konzentration zu den fünf Untersuchungszeitpunkten im Serum der Probanden (Tabelle 15) fiel auf, dass die Standardabweichungen stark streuten und somit in allen Fällen deutlich höher waren als die Mittelwerte (Abbildung 19). Die Spanne der Konzentrationen der Einzeltiere reichte von 0 bis 20000 pg/ml.

**Tabelle 15:** Mittelwert und Standardabweichung der IL-1 Konzentration (pg/ml).

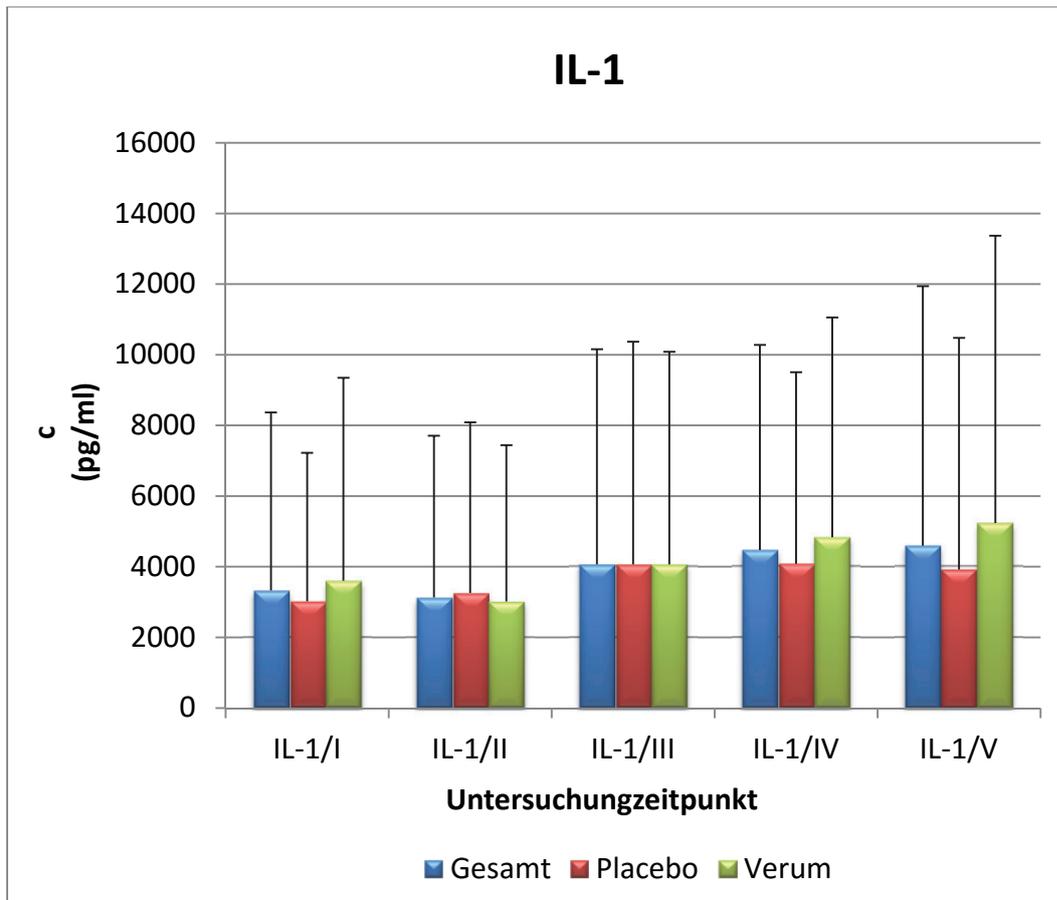
<u>c (pg/ml)</u>	<u>IL-1/I</u>	<u>IL-1/II</u>	<u>IL-1/III</u>	<u>IL-1/IV</u>	<u>IL-1/V</u>
MW Gesamtgruppe	3330,7	3130,3	4066,1	4473,1	4594,0
SD Gesamtgruppe	5035,4	4576,1	6093,0	5804,9	7347,1
MW Verum	3604,3	3018,6	4066,9	4832,2	5236,9
SD Verum	5742,4	4424,7	6020,3	6225,7	8132,5
MW Placebo	3023,0	3255,9	4065,2	4082,7	3920,5
SD Placebo	4202,1	4833,2	6303,6	5422,1	6556,1

MW Mittelwert

SD Standardabweichung

c Konzentration

I bis V = Untersuchungszeitpunkte



**Abbildung 19:** Mittelwert und Standardabweichung der IL-1 Konzentration.

Um eine Aussage über die Entwicklung der IL-1 Konzentrationen nach der Impfung bzw. über die Saison hinweg treffen zu können, wurde als erstes die Konzentration der Erstuntersuchung (Nullwert/Ausgangswert I) mit den Werten der Folgeuntersuchungen (II bis V) in der Gesamtgruppe sowie den beiden Untergruppen verglichen. Bei diesem Vergleich war der Verlauf in allen drei Gruppen annähernd gleich, wobei in der Verumgruppe die Unterschiede, im Gegensatz zur Placebogruppe, teilweise statistisch signifikant waren. Der Trend war jedoch in beiden Fällen und in der Gesamtgruppe deutlich sichtbar (Tabelle 16).

**Tabelle 16:** Verlauf der IL-1 Konzentration im Vergleich mit dem Ausgangswert.

Untersuchungszeitpunkt	I-II	I-III	I-IV	I-V
Gesamtgruppe	↓ *	↓→	↑ *	↓→
Verumgruppe	↓ *	↓→	↑ *	↓
Placebogruppe	↓	↓→	↑	↓

\* statistisch signifikant

↓ = die Zytokinkonzentration fällt zwischen den Untersuchungszeitpunkten ab

→ = die Zytokinkonzentration bleibt zwischen den Untersuchungszeitpunkten gleich

↑ = die Zytokinkonzentration steigt zwischen den Untersuchungszeitpunkten an

↓→ = die Zytokinkonzentration fällt bei etwa der Hälfte der Pferde ab bzw. bleibt bei etwa der Hälfte der Pferde gleich

Von der EU (Besuch I) auf den Termin der ersten Nachimpfung (Besuch II) fiel die Konzentration des Zytokins im Serum der Pferde von mehr Tieren ab als sie anstiegen. Im Vergleich der Besuche I auf III begann langsam die Umkehr (es fielen immer noch mehr Werte ab als sie anstiegen, allerdings stieg die Anzahl der Tiere, deren Wert zwischen den Untersuchungen gleich blieb), der Vergleich der Besuche I und IV stellte dann den Umkehrpunkt dar. Hier stieg die Konzentration bei deutlich mehr Pferden im Vergleich zum Ausgangswert an, als sie abfiel, es gab auch keine Tiere, die denselben Wert hatten. Beim Vergleich der EU mit der AU war schließlich wieder ein ähnliches Bild wie am Anfang, es hatten deutlich mehr Tiere einen niedrigeren Wert bei Besuch V (AU) im Vergleich zum Besuch I (EU). Signifikante Unterschiede zwischen den Terminen zeigte die Verumgruppe beim Vergleich Besuch I und II ( $p=0,042$ ) sowie bei Besuch I und IV ( $p=0,032$ ), gleichfalls wie die Gesamtgruppe (Verum und Placebo) ( $p=0,01$  bzw.  $p=0,004$ ).

Nun wurde der Verlauf der Werte zwischen den einzelnen Untersuchungszeitpunkten verglichen (Tabelle 17). Wie oben bereits beschrieben, war der Unterschied zwischen Besuch I und II in der Gesamtgruppe und in der Verumgruppe signifikant. Hierbei fielen die Werte bei mehr Pferden ab als sie anstiegen. Beim Vergleich Besuch II und III lagen sehr viele Bindungen vor, d.h. Pferde, deren Werte bei beiden Terminen gleich waren. Dies war in der Gesamtgruppe bei 36 Prozent (18/50) der Pferde, in der Placebogruppe bei 33 Prozent (8/24) und in der Verumgruppe bei 38 Prozent (10/26) der Pferde der Fall. Des Weiteren stiegen die Konzentrationen zwischen den zwei

Folgeimpfbesuchen in der Gesamt-( $p=0,004$ ) und der Verumgruppe ( $p=0,017$ ) statistisch signifikant an, während in der Placebogruppe annähernd gleich viele Tiere anstiegen (9/24), abfielen (7/24) oder gleich blieben (8/24).

Zwischen den Besuchen III und IV (letzter Impftermin und Zwischenuntersuchung) war die Umkehr der Konzentration schließlich am deutlichsten. Hierbei stiegen die IL-1 Werte bei dem Großteil der Pferde an. Auch dieser Unterschied war in der Gesamtgruppe ( $p=0,046$ ) signifikant, in den beiden Einzelgruppen aufgrund der jeweils kleineren Fallzahl nicht. Bringt man nun als Letztes die Konzentrationen des IL-1 zwischen der Zwischen- und der Abschlussuntersuchung im November in Verbindung, so war hier wieder eine Umkehr erkennbar. So fielen die Werte zwischen diesen Besuchen bei dem Großteil der Pferde, wobei in der Verumgruppe je zwei Pferde denselben Wert bei beiden Untersuchungen aufwiesen, in der Placebogruppe ein Pferd. Auch dieser Unterschied war nur in der Gesamtgruppe signifikant ( $p=0,018$ ).

**Tabelle 17:** Vergleich der IL-1 Konzentration zwischen den aufeinander-folgenden Untersuchungszeitpunkten.

Untersuchungszeitpunkt	I-II	II-III	III-IV	IV-V
Gesamtgruppe	↓↓ *	↑→ *	↑↑ *	↓↓ *
Verumgruppe	↓ *	↑→ *	↑	↓
Placebogruppe	↓	→	↑	↓

\* statistisch signifikant

↓ = die Zytokinkonzentration fällt zwischen den Untersuchungszeitpunkten ab

→ = die Zytokinkonzentration bleibt zwischen den Untersuchungszeitpunkten gleich

↑ = die Zytokinkonzentration steigt zwischen den Untersuchungszeitpunkten an

↑→ = die Zytokinkonzentration steigt bei etwa der Hälfte der Pferde an bzw. bleibt bei etwa der Hälfte der Pferde gleich

↓→ = die Zytokinkonzentration fällt bei etwa der Hälfte der Pferde ab bzw. bleibt bei etwa der Hälfte der Pferde gleich

↑↑ = starker Anstieg

↓↓ = starker Abfall

Allgemein ließ sich beim IL-1 ein stark saisonaler Trend der Konzentrationen im Serum darstellen, da der Verlauf in beiden Gruppen und somit auch in der Gesamtgruppe annähernd gleich war.

So fielen die Werte Anfang des Jahres in der insektenfreien Zeit ab, um im Sommer deutlich anzusteigen –dies mag an der erhöhten Insektenexposition liegen- um schließlich mit Abnahme der Exposition auch wieder abzufallen.

#### 4.2.3.4.2 Interleukin 4

Ebenso wie bereits bei IL-1 beschrieben, schwankten auch bei IL-4 die Werte stark. Somit waren in beiden Gruppen auch hier die Standardabweichungen höher als die Mittelwerte (Tabelle 18; Abbildung 20). Die Spanne der Konzentrationen der Einzeltiere reichte von 0 bis 2500 pg/ml.

**Tabelle 18:** Mittelwert und Standardabweichung der IL-4 Konzentration (pg/ml).

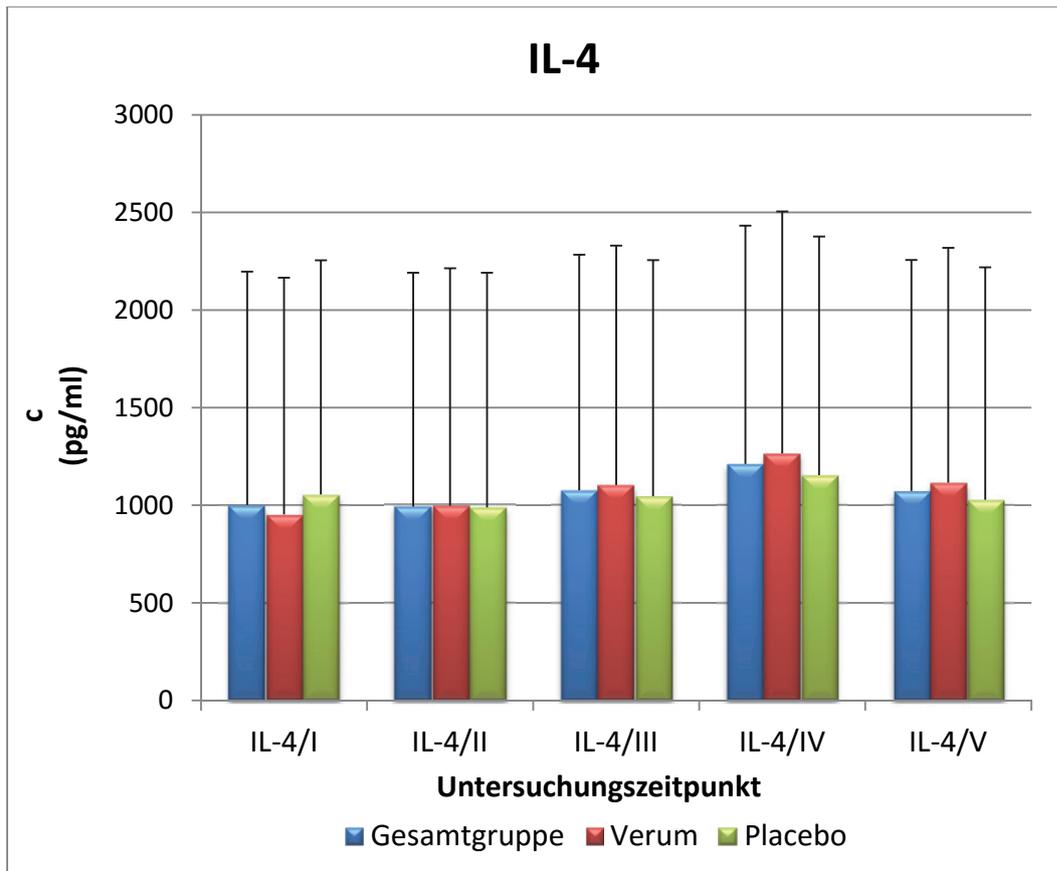
<u>c (pg/ml)</u>	<u>IL-4/I</u>	<u>IL-4/II</u>	<u>IL-4/III</u>	<u>IL-4/IV</u>	<u>IL-4/V</u>
MW Gesamtgruppe	1001,3	992,8	1076,3	1211,7	1073,0
SD Gesamtgruppe	1195,6	1197,9	1207,0	1220,3	1183,6
MW Verum	953,1	996,7	1103,1	1265,0	1115,5
SD Verum	1212,9	1217,6	1226,8	1240,4	1203,0
MW Placebo	1055,5	988,6	1046,1	1153,8	1028,3
SD Placebo	1199,4	1202,3	1209,9	1223,3	1190,8

MW Mittelwert

SD Standardabweichung

c Konzentration

I bis V = Untersuchungszeitpunkte



**Abbildung 20:** Mittelwert und Standardabweichung der IL-4 Konzentration.

IL-4, als Th2-Leitzytokin, war mit 97 über dem höchsten Standard liegenden Werten, das Zytokin mit den am Abstand höchsten Werten. Hierbei teilte sich die Gruppe relativ gleichverteilt in Pferde, die bei allen fünf Untersuchungszeitpunkten einen Wert über der Nachweisgrenze hatten (n=19), in Tiere, bei denen kein IL-4 im Serum nachgewiesen werden konnte (n=17), und in Probanden, die ein messbares Ergebnis innerhalb der Nachweisgrenze hatten (n=15) auf. Die Pferde mit einem messbaren Ergebnis bei wenigstens einer Untersuchung ließen sich nochmals in drei Gruppen unterteilen: drei Pferde hatten bei allen Untersuchungszeitpunkten einen Wert innerhalb der Nachweisgrenze. Ebenfalls drei Pferde hatten, neben einem messbaren Wert, Werte über der Nachweisgrenze und neun Pferde hatten zudem je mindestens einen Nullwert. Interessant war, dass bei zwei Tieren (Nr. 31 und 35) alle drei Situationen zutrafen. Sie hatten mindestens einen Nullwert, einen Wert innerhalb und einen oberhalb der Nachweisgrenze.

Auch bei IL-4 wurden zunächst die Werte der Untersuchungen II bis V mit dem Ausgangswert der Untersuchung I verglichen. Hierbei waren, aufgrund der hohen Anzahl an Bindungen, weder zwischen den beiden Gruppen (Verum und Placebo) noch zwischen den Untersuchungszeitpunkten statistisch signifikante Unterschiede feststellbar. Auch bei der Gegenüberstellung der aufeinander folgenden Untersuchungszeitpunkte blieb das Ergebnis gleich. Auch hier war kein signifikanter Unterschied zwischen den Zeitpunkten und den Gruppen nachweisbar. Auch dies ließ sich auf die hohe Anzahl an Bindungen (= gleiche Werte zu den verschiedenen Zeitpunkten) zurückführen. Schlüsselte man die Bindungen in den zwei Gruppen auf, so hatte man in der Placebogruppe 13 Pferde mit gleichen Werten zu allen Zeitpunkten (5 Pferde = 0; 8 Pferde > 2000 pg/ml) in der Verumgruppe 21 Tiere (12 Pferde= 0; 9 Pferde > 2000pg/ml).

## 4.2.3.4.3 Interleukin 10

Auch das als Schlüsselzytokin in der Vermittlung von Toleranz bei überschießenden Immunreaktionen bekannte IL-10 wurde im Rahmen dieser Studie untersucht. Auch hier lagen in beiden Gruppen sehr viele Rangbindungen vor, wobei diese meist oberhalb der Nachweisgrenze zu finden waren.

Ebenso wie bei den beiden anderen Interleukinen streuten die Einzelwerte zwischen 0 pg/ml und 25000 pg/ml sehr stark. Daher waren auch hier die Standardabweichungen höher als der eigentliche Mittelwert (Tabelle 19; Abbildung 21).

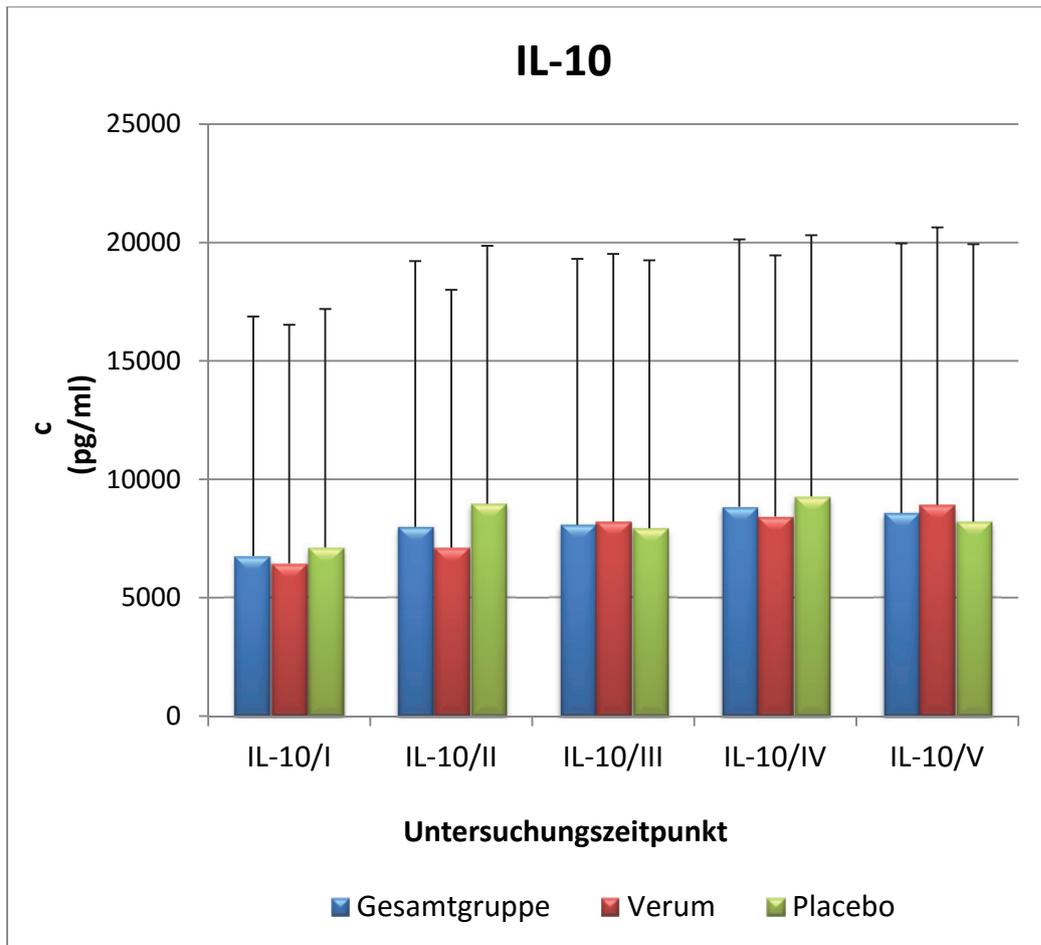
**Tabelle 19:** Mittelwert und Standardabweichung der IL-10 Konzentration (pg/ml).

<u>c (pg/ml)</u>	<u>IL-10/I</u>	<u>IL-10/II</u>	<u>IL-10/III</u>	<u>IL-10/IV</u>	<u>IL-10/V</u>
MW Gesamtgruppe	6759,9	7987,2	8076,0	8837,0	8574,5
SD Gesamtgruppe	10115,1	11230,9	11232,0	11292,4	11387,4
MW Verum	6443,0	7113,7	8204,7	8430,8	8920,7
SD Verum	10079,1	10889,9	11317,1	11030,5	11716,4
MW Placebo	7116,4	8969,9	7931,2	9278,6	8211,8
SD Placebo	10079,1	10889,9	11317,1	11030,5	11716,4

MW Mittelwert

SD Standardabweichung

c Konzentration



**Abbildung 21:** Mittelwert und Standardabweichung der IL-10 Konzentration.

Beim Vergleich der Untersuchungszeitpunkte II bis IV mit dem Ausgangswert (I) stiegen die Werte in beiden Gruppen deutlich an. Dies war in der Verumgruppe zu allen Zeitpunkten (I mit II, I mit III, I mit IV und I mit V) signifikant ( $p < 0,05$ ), in der Gegenüberstellung Zeitpunkt I mit V sogar hochsignifikant ( $p = 0,01$ ). In der Placebogruppe waren die Vergleiche I mit II und I mit IV signifikant, alles in allem waren die Effekte aber viel weniger deutlich als in der Verumgruppe (Tabelle 20).

**Tabelle 20:** Verlauf der IL-10 Konzentration im Vergleich mit dem Ausgangswert.

Untersuchungszeitpunkt	I-II	I-III	I-IV	I-V
Verumgruppe	↑↑→ *	↑↑→ *	↑↑ *	↑↑ *
Placebogruppe	↑↑→	↑→	↑	↑→ *

\* statistisch signifikant

↑ = die Zytokinkonzentration steigt zwischen den Untersuchungszeitpunkten an

→ = die Zytokinkonzentration bleibt zwischen den Untersuchungszeitpunkten gleich

↑↑ = starker Anstieg

↑→ = die Zytokinkonzentration steigt bei etwa der Hälfte der Pferde an bzw. bleibt bei etwa der Hälfte der Pferde gleich

Betrachtet man nun die Beziehungen der aufeinanderfolgenden Untersuchungen, so unterschieden sich die beiden Gruppen etwas (Tabelle 21).

**Tabelle 21:** Vergleich der IL-10 Konzentration der aufeinanderfolgenden Untersuchungszeitpunkte.

Untersuchungszeitpunkt	I-II	II-III	III-IV	IV-V
Verumgruppe	↑→ *	↑ *	↑	↓↓
Placebogruppe	↑	→	↑ *	↓

\* statistisch signifikant ( $p < 0,05$ )

↑ = die Zytokinkonzentration steigt zwischen den Untersuchungszeitpunkten an

↓ = die Zytokinkonzentration fällt zwischen den Untersuchungszeitpunkten ab

→ = die Zytokinkonzentration bleibt zwischen den Untersuchungszeitpunkten gleich

↓↓ = starker Abfall

↑→ = die Zytokinkonzentration steigt bei etwa der Hälfte der Pferde an bzw. bleibt bei etwa der Hälfte der Pferde gleich

In der Placebogruppe stiegen die Werte von Untersuchung I auf II signifikant an ( $p=0,011$ ), waren genau gleichverteilt bei Untersuchung II und III, stiegen dann wieder signifikant an ( $p=0,012$ ), um zwischen der Zwischen- und Abschlussuntersuchung abzufallen. In der Verumgruppe stiegen die Konzentrationen von IL-10 von Untersuchung I zu Untersuchung II an, um dann ebenso wie in der Placebogruppe von der

Zwischen –zur Abschlussuntersuchung deutlich abzufallen. Dies war allerdings nur ein Trend und nicht statistisch signifikant.

#### 4.2.3.4.4 Interferon Gamma

Auch bei IFN $\gamma$ , dem Leitzytokin der Th1-Immunantwort, gab es in beiden Gruppen viele Pferde, die zu mehreren Untersuchungszeitpunkten den gleichen Wert hatten (Rangbindungen), welche aber hauptsächlich unterhalb der Nachweisgrenze bei Null lagen. Die Nachweisgrenze von IFN $\gamma$  lag zwischen 0 pg/ml und 5000 pg/ml. Mittelwert und Standardabweichung der Untersuchungszeitpunkte sind aus Tabelle 22 zu entnehmen. Auch hier streuten die Werte der Patienten sehr stark (Abbildung 22).

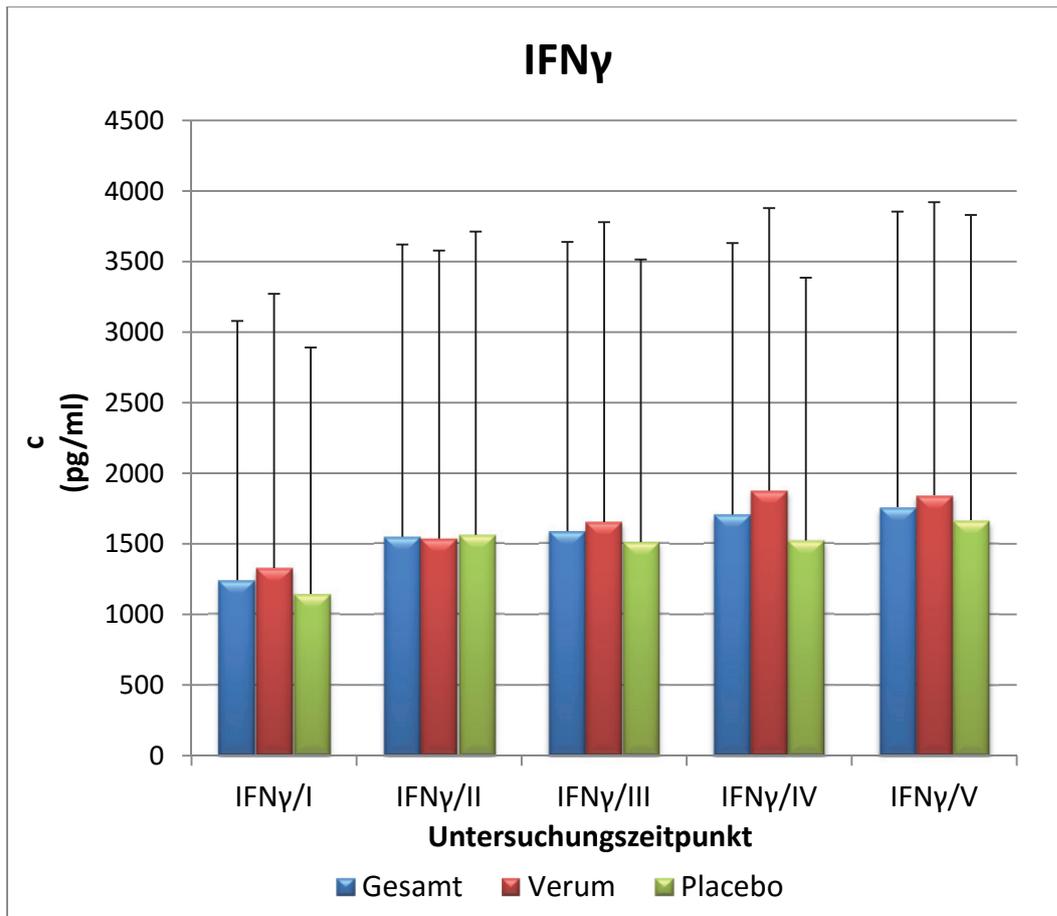
**Tabelle 22:** Mittelwert und Standardabweichung der IFN $\gamma$  Konzentration (pg/ml).

c (pg/ml)	IFN $\gamma$ /I	IFN $\gamma$ /II	IFN $\gamma$ /III	IFN $\gamma$ /IV	IFN $\gamma$ /V
MW Gesamtgruppe	1242,0	1549,8	1589,2	1707,3	1760,4
SD Gesamtgruppe	1837,5	2071,1	2050,0	1924,4	2093,5
MW Verum	1328,5	1537,0	1654,3	1875,5	1844,7
SD Verum	1943,5	2041,2	2125,5	2003,7	2075,8
MW Placebo	1144,8	1564,2	1512,9	1524,6	1667,6
SD Placebo	1746,9	2148,2	2002,4	1861,4	2162,7

MW Mittelwert

SD Standardabweichung

c Konzentration



**Abbildung 22:** Mittelwert und Standardabweichung der IFN $\gamma$  Konzentration.

Sowohl in der Verum- als auch in der Placebogruppe waren die Werte der Pferde bei den Folgeuntersuchungen (II bis V) höher als bei dem Ausgangswert der Erstuntersuchung (I) (Tabelle 23). Dieser Anstieg war in der Verumgruppe beim Vergleich der Zeitpunkte der letzten Impfung (III), der Zwischenuntersuchung (IV) und der Abschlussuntersuchung (V) mit der Erstuntersuchung (Nullwert, I) signifikant.

**Tabelle 23:** Verlauf der IFN $\gamma$  Konzentration im Vergleich mit dem Ausgangswert.

Untersuchungszeitpunkt	I-II	I-III	I-IV	I-IV
Verum	↑→	↑↑→ *	↑↑→ *	↑↑ *
Placebo	↑→	(↑)→	↑	↑

\* statistisch signifikant

↑ = die Zytokinkonzentration steigt zwischen den Untersuchungszeitpunkten bei einem Großteil der Pferde an

→ = die Zytokinkonzentration bleibt zwischen den Untersuchungszeitpunkten bei einem Großteil der Pferde gleich

↑↑ = starker Anstieg

↑→ = die Zytokinkonzentration steigt bei etwa der Hälfte der Pferde an bzw. bleibt bei etwa der Hälfte der Pferde gleich

( ) = nur Tendenz erkennbar/minimaler Anstieg/Abfall

Bei Betrachtung der jeweils aufeinanderfolgenden Untersuchungszeitpunkte stieg in der Verumgruppe die IFN $\gamma$  Konzentration von der Erstuntersuchung bis zur Zwischenuntersuchung (Beprobung I bis IV) kontinuierlich, wenn auch nicht statistisch signifikant, an. Zwischen der ZU und der AU fielen die Werte in beiden Gruppen. In der Placebogruppe war, im Gegensatz zur Verumgruppe, zwischen den Impfterminen II und III ein deutlicher Abfall der IFN $\gamma$  Konzentration im Serum der Pferde zu finden (Tabelle 24), bei den anderen Terminen verhielten sich beide Gruppen gleich, wenn auch der Anstieg in der Verumgruppe deutlicher war als in der Placebogruppe (Tabelle 24).

**Tabelle 24:** Vergleich der IFN $\gamma$  Konzentration zwischen den aufeinander-folgenden Untersuchungszeitpunkten.

Untersuchungszeitpunkt	I-II	II-III	III-IV	IV-V
Verum	↑→	↑	↑	↓
Placebo	↑→	↓↓	↑	→

↑ = die Zytokinkonzentration steigt zwischen den Untersuchungszeitpunkten bei einem Großteil der Pferde an

↓ = die Zytokinkonzentration fällt zwischen den Untersuchungszeitpunkten bei einem Großteil der Pferde ab

→ = die Zytokinkonzentration bleibt zwischen den Untersuchungszeitpunkten bei einem Großteil der Pferden gleich

↑→ = die Zytokinkonzentration steigt bei etwa der Hälfte der Pferde an bzw. bleibt bei etwa der Hälfte der Pferde gleich

↑↑ = starker Anstieg

↓↓ = starker Abfall

Hier zeigte sich, dass durch ID eine immunmodulatorische Wirkung entstand, die den von Natur aus in der Placebogruppe bestehenden Effekt (Anstieg des Zytokins im Laufe des Jahres bis zum Sommer) verstärkte, bzw. wie bei den Untersuchungszeitpunkten II auf III sichtbar wurde, sogar pusht und umkehrte (Tabelle 25).

**Tabelle 25:** Beispielhafte Darstellung der IFN $\gamma$  Konzentrationen (pg/ml) bei je zwei Verum- und Placebopferden zu den fünf Untersuchungszeitpunkten.

Nr.	V/P	c IFN $\gamma$ /I (pg/ml)	c IFN $\gamma$ /II (pg/ml)	c IFN $\gamma$ /III (pg/ml)	c IFN $\gamma$ /IV (pg/ml)	c IFN $\gamma$ /V (pg/ml)
28	V	3497,9	3765,1	3872,9	4277,1	3614,7
6	V	0,0	139,5	149,8	604,9	379,8
45	P	94,3	100,5	56,4	97,0	0,0
20	P	23,3	58,4	0,0	341,0	112,6

c Konzentration

V Verum

P Placebo

## 4.2.3.4.5 Tumornekrosefaktor Alpha

Mit Tumornekrosefaktor Alpha (TNF $\alpha$ ) wurde ein weiteres sehr wichtiges Zytokin der Th1-Immunantwort untersucht. Auch hier lagen in beiden Gruppen viele Rangbindungen vor (mehrfach gleiche Werte bei einem Patienten). Diese teilten sich relativ exakt in Werte ober- und unterhalb der Nachweisgrenze auf. Daher streuten auch beim letzten im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Zytokin die Werte um den Mittelwert stark (Tabelle 26; Abbildung 23). Das messbare Intervall für TNF $\alpha$  lag zwischen 0 pg/ml und 2500 pg/ml.

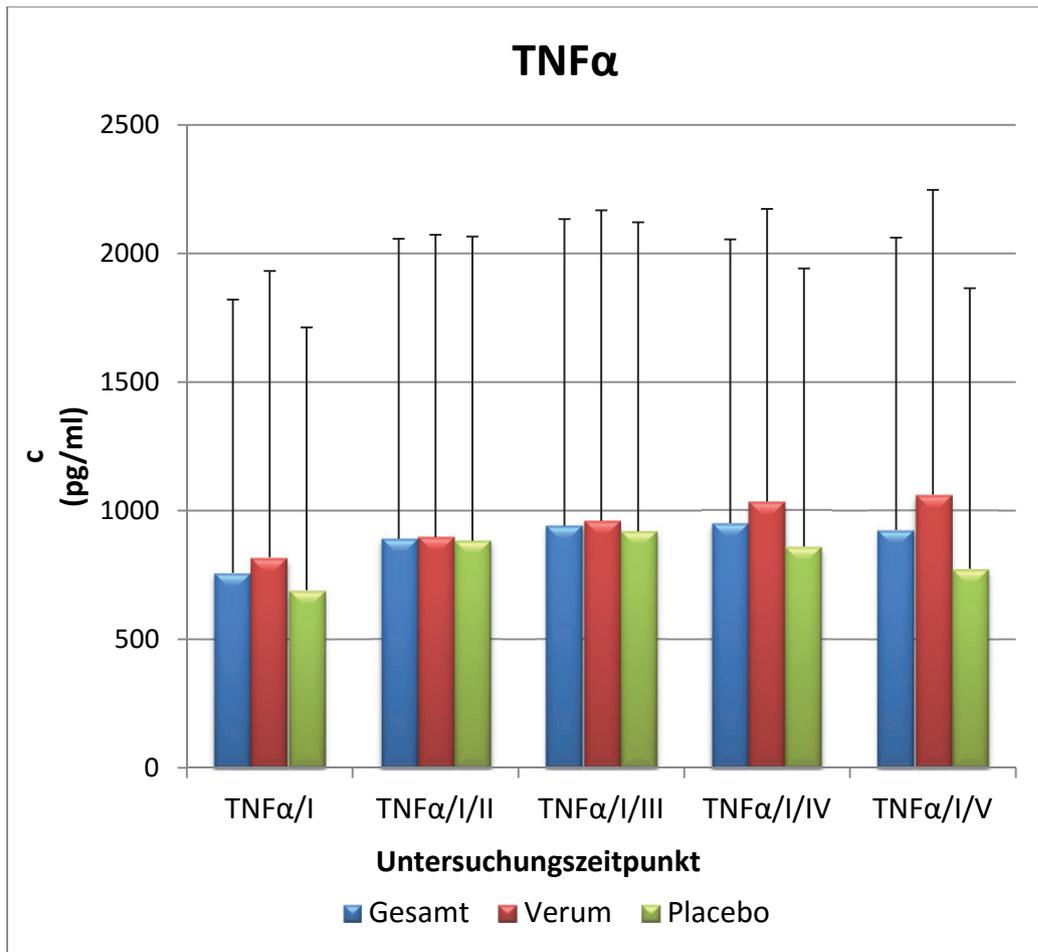
**Tabelle 26:** Mittelwert und Standardabweichung der TNF $\alpha$  Konzentration (pg/ml).

c (pg/ml)	TNF $\alpha$ /I	TNF $\alpha$ /II	TNF $\alpha$ /III	TNF $\alpha$ /IV	TNF $\alpha$ /V
MW Gesamtgruppe	758,1	890,7	941,1	951,3	925,0
SD Gesamtgruppe	1063,0	1166,9	1192,9	1103,4	1136,6
MW Verum	818,2	897,4	960,3	1035,0	1062,1
SD Verum	1114,0	1175,3	1207,8	1138,6	1185,1
MW Placebo	690,6	883,2	919,5	860,3	774,3
SD Placebo	1022,0	1182,7	1201,6	1081,7	1090,8

MW Mittelwert

SD Standardabweichung

c Konzentration



**Abbildung 23:** Mittelwert und Standardabweichung der TNFα Konzentration.

Bei genauerer Betrachtung des TNFα im Verlauf der Untersuchungen fiel ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Gruppen auf. So war in der Placebogruppe zwischen den Untersuchungen II und III im Verhältnis zum Ausgangswert der Untersuchung I kein Effekt sichtbar (Tabelle 27). Bei der Zwischenuntersuchung Sommer (IV) stiegen die Werte der Placebos im Vergleich zur Erstuntersuchung an, allerdings im nicht signifikanten Bereich, was an der großen Anzahl an Rangbindungen lag. Auch bei der Gegenüberstellung von Erst- und Abschlussuntersuchung blieben die Werte gleich bzw. fielen etwas ab.

**Tabelle 27:** Verlauf der TNF $\alpha$  Konzentration im Vergleich mit dem Ausgangswert.

Untersuchungszeitpunkt	I-II	I-II	I-IV	I-V
Verum	↑ *	↑↑ *	↑↑↑ *	↑↑↑ *
Placebo	→	(↑)→	↑↑	(↓)→

\* statistisch signifikant

↑ = die Zytokinkonzentration steigt zwischen den Untersuchungszeitpunkten bei einem Großteil der Pferde an

↓ = die Zytokinkonzentration fällt zwischen den Untersuchungszeitpunkten bei einem Großteil der Pferde ab

→ = die Zytokinkonzentration bleibt zwischen den Untersuchungszeitpunkten bei einem Großteil der Pferde gleich

↑↑ = starker Anstieg

↑↑↑ = extrem starker Anstieg

() = nur Tendenz erkennbar/minimaler Anstieg/Abfall

Bei der Auswertung der aufeinanderfolgenden Untersuchung konnte in dieser Gruppe zwischen der dritten und vierten Blutentnahme ein Anstieg der Konzentration festgestellt werden. Im Gegenzug dazu fielen die Werte zwischen Untersuchung II und III ebenso wie zwischen der Zwischen- (IV) und Abschlussuntersuchung (V) bei mehr Pferden, als sie anstiegen (Tabelle 28). Alles in allem waren keine großen Unterschiede bzw. gerichteten Effekte sichtbar.

**Tabelle 28:** Vergleich der TNF $\alpha$  Konzentration zwischen den aufeinander-folgenden Untersuchungszeitpunkten.

Untersuchungszeitpunkt	I-II	II-III	III-IV	IV-V
Verum	↑	↑	↑	→
Placebo	→	(↓)→	↑	↓↓

↑ = die Zytokinkonzentration steigt zwischen den Untersuchungszeitpunkten bei einem Großteil der Pferde an

↓ = die Zytokinkonzentration fällt zwischen den Untersuchungszeitpunkten bei einem Großteil der Pferde ab

→ = die Zytokinkonzentration bleibt zwischen den Untersuchungszeitpunkten bei einem Großteil der Pferde gleich

↓↓ = starker Abfall

() = nur Tendenz erkennbar/minimaler Anstieg/Abfall

Anders war es in der Verumgruppe. Hier waren deutlich gerichtete Effekte der TNF $\alpha$  Konzentrationen zwischen den Untersuchungszeitpunkten sichtbar. So stiegen die Konzentrationen über alle Untersuchungszeitpunkte hinweg an und blieben letztendlich zwischen der Zwischen- und der Abschlussuntersuchung ungefähr auf demselben Level (Tabelle 28).

Dieser Anstieg war für alle Untersuchungszeitpunkte im Vergleich zum Nullwert (Untersuchung I) signifikant (Tabelle 27).

Betrachtet man die aufeinanderfolgenden Blutentnahmezeitpunkte, so war ein sehr starker Anstieg der Konzentrationen bei der Mehrzahl der Tiere zwischen den zwei letzten Impfterminen (II und III) und zwischen dem letzten Impftermin und der Zwischenuntersuchung (III und IV) sichtbar (Tabelle 29; Abbildung 24). Dieser war allerdings aufgrund der gleichzeitig vorliegenden extrem hohen Anzahl an Rangbindungen (deutlich über 50% der Patienten) nicht statistisch signifikant. Die genauen Zahlen können aus Tabelle 29 entnommen werden. Abbildung 25 zeigt die Entwicklung der Konzentrationen in der Verum- und der Placebogruppe.

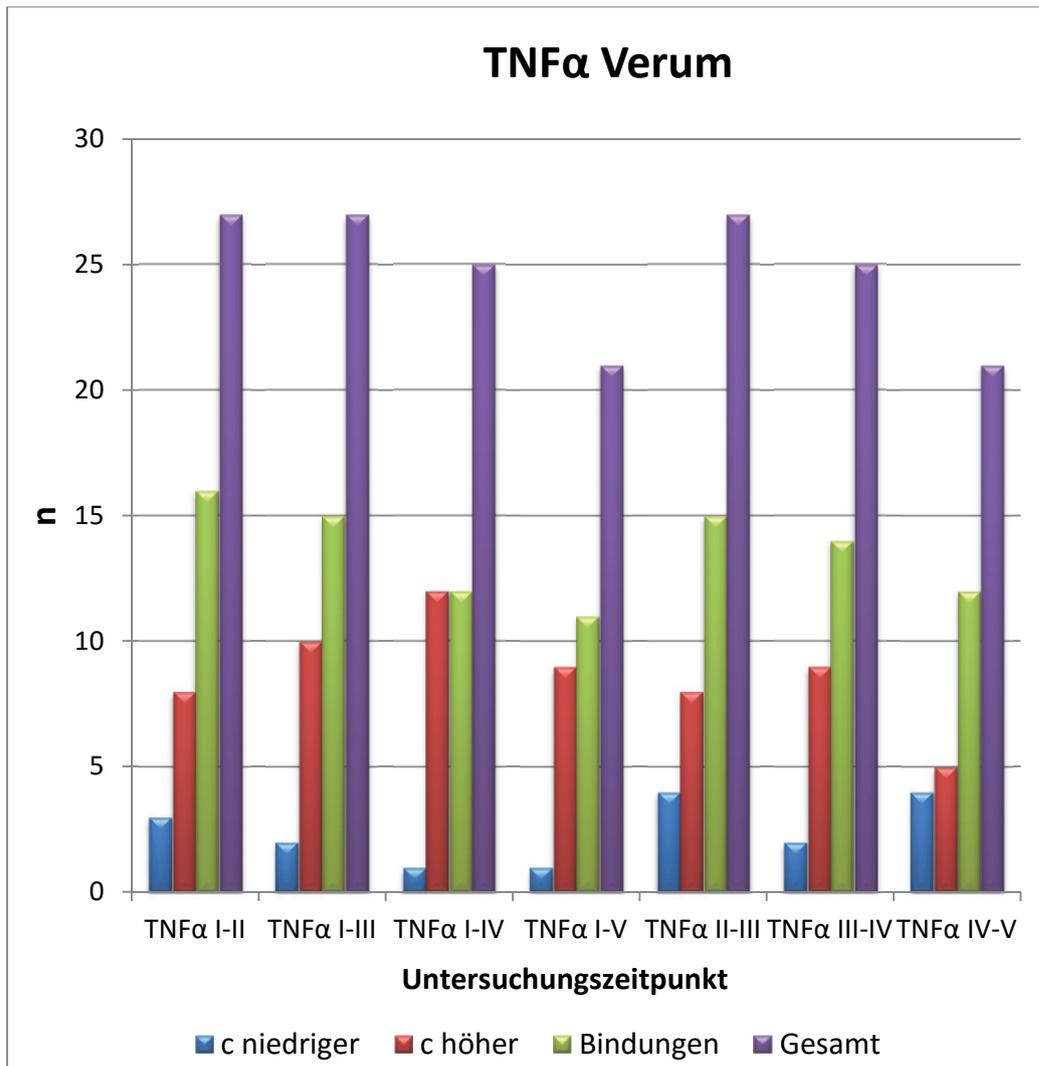
**Tabelle 29:** Tabellarische Darstellung der Entwicklung der TNF $\alpha$  Konzentration im Vergleich der verschiedenen Untersuchungszeitpunkte.

<u>Untersuchung</u>	<u>TNF<math>\alpha</math></u>						
<u>Verum</u>	<u>I-II</u>	<u>I-III</u>	<u>I-IV</u>	<u>I-V</u>	<u>II-III</u>	<u>III-IV</u>	<u>IV-V</u>
Anzahl Pferde c niedriger	3	2	1	1	4	2	4
Anzahl Pferde c höher	8	10	12	9	8	9	5
Bindungen	16	15	12	11	15	14	12
Gesamtanzahl	27	27	25	21	27	25	21
Signifikanz p	0,041	0,015	0,004	0009	-	-	-
<u>Untersuchung</u>							
<u>Placebo</u>							
Anzahl Pferde c niedriger	6	6	5	6	6	3	8
Anzahl Pferde c höher	7	8	12	5	4	9	4
Bindungen	11	10	6	9	14	11	7
Gesamtanzahl	24	24	23	20	24	23	19
Signifikanz p	-	-	-	-	-	-	-

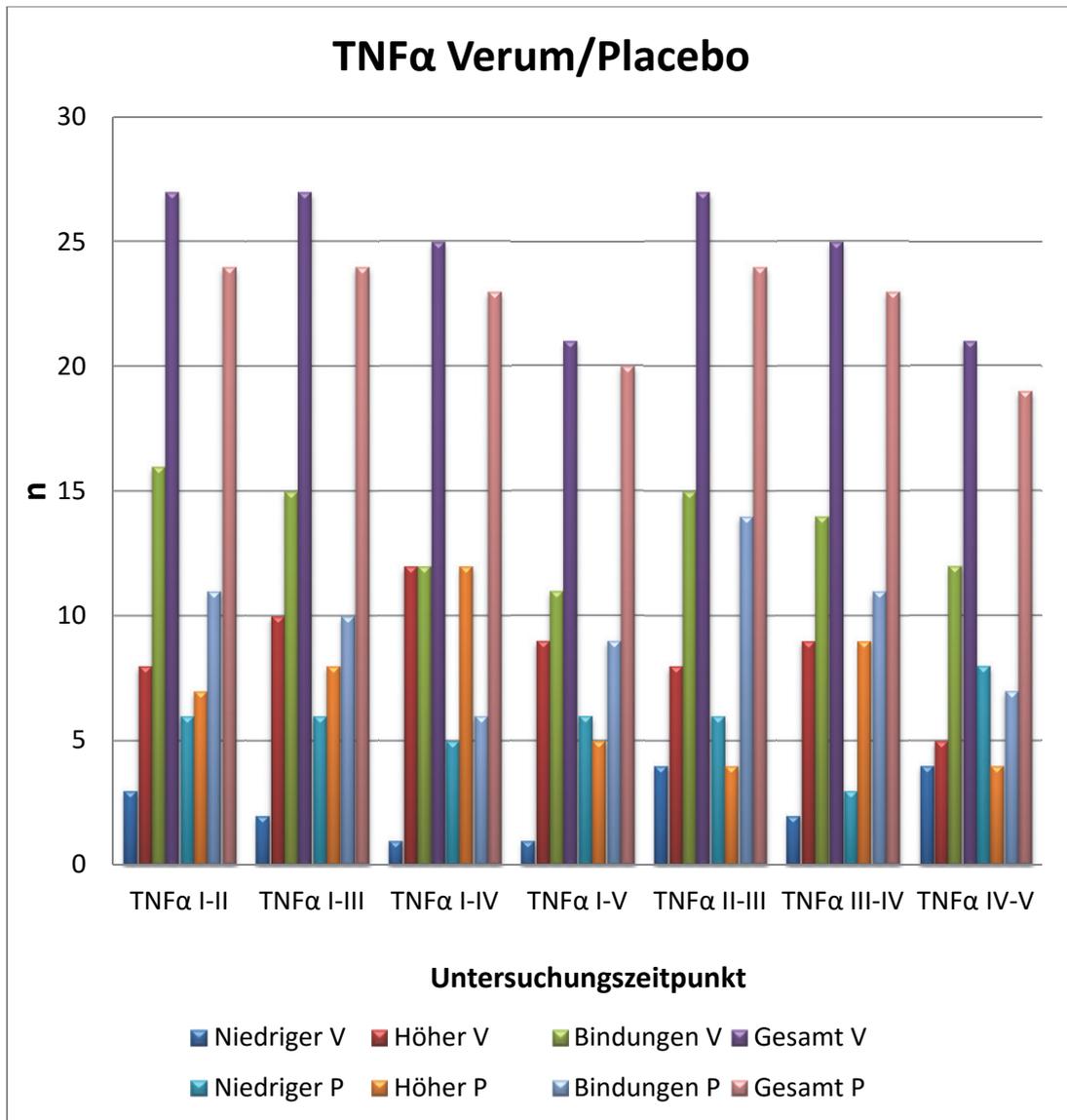
c Konzentration

Pferde c niedriger/höher = n Pferde zeigen zwischen den Untersuchungszeitpunkten eine niedrigere/höhere TNF $\alpha$  Konzentration im Vergleich zum Ausgangswert (I) oder dem Wert der vorherigen Untersuchung

Bindungen = n Pferde zeigen den gleichen Wert zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten



**Abbildung 24:** Graphische Darstellung TNF $\alpha$  Verum (c Konzentration, n Anzahl).



**Abbildung 25:** Vergleich Entwicklung TNF $\alpha$  Verum vs. Placebo (V Verum, P Placebo).

#### 4.2.3.4.6 Korrelation der Zytokinkonzentrationen und Scores

Als letzter Punkt der Zytokinauswertung wurden die Werte der Untersuchungen I, IV und V mit den Scores desselben Untersuchungstages verglichen, um eine eventuelle Korrelation dieser Werte herauszufinden. Hierbei konnte weder in der Gesamt-, noch in der Verum- oder Placebogruppe ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den fünf untersuchten Zytokinen und der klinischen Ausprägung (Höhe des Scores) und der Höhe/dem Verlauf der Zytokine festgestellt werden. Hierbei lag der Korrelationskoeffizient in den meisten Fällen unter 0,1. Es ließ sich daher weder von der Höhe der Zytokinkonzentration auf den Schweregrad der klinischen Ausprägung, noch umgekehrt von der Stärke der Symptome auf die Immunlage der Tiere schließen.

### 4.3 Effekt der Insol® Dermatophyton Behandlung im Vergleich zum Vorjahr

Den Besitzerfragebogen zu möglichen Effekten der Insol® Dermatophyton Behandlung im Vergleich zum Vorjahr beantworteten 37 Besitzer für ihre Pferde, wobei 21 Teilnehmer aus der Placebogruppe und 16 Teilnehmer aus der Verumgruppe stammten.

Der Beginn der Symptome des Sommerexzems und ihre Dauer waren 2010 in beiden Gruppen gleich. So war bei den meisten Pferden im Durchschnitt im Monat Juni der Start der stärksten Symptome. Dieses Intervall dauerte im Mittel vier Monate, sowohl in der Verum- als auch in der Placebogruppe. Dies war, laut Besitzerangaben, in der Verumgruppe im Untersuchungsjahr 2011 genauso. Hier war ebenfalls der mittlere Beginn der Symptome im Juni und dauerte vier Monate. Anders war es in der Placebogruppe. Hier begannen 2011 die Symptome im Mittel hochsignifikant ( $p=0,002$ ) einen Monat später, nämlich im Juli. Ebenso war die Zeitspanne mit drei Monaten hochsignifikant kürzer ( $p=0,001$ ) als im Vorjahr.

Bei der Beurteilung der allgemeinen Ausprägung der Symptome im Vergleich des Studienjahres mit dem Jahr zuvor durch die Besitzer waren in der Placebogruppe 48 Prozent (10/21) der Patienten besser als im Vorjahr, 52 Prozent (11/21) gleich oder schlechter als 2010. Die Pferde der Verumgruppe verbesserten sich mit 69 Prozent (11/16) der Tiere signifikant ( $p=0,012$ ) im Vergleich zum unbehandelten Vorjahr. Der direkte Vergleich der beiden Gruppen und Jahre war allerdings nicht signifikant.

Des Weiteren wurde nach dem Schweregrad der im Durchschnitt am stärksten betroffenen Regionen gefragt. Im Einzelnen sind das Mähne, Schweif, Unterbauch,

Kopf und Vorderbrust. Hierbei war im Vergleich der beiden Jahre in der Verumgruppe die Mähne im Behandlungsjahr signifikant besser ( $p=0,047$ ), in der Placebogruppe ebenfalls die Mähne ( $p=0,017$ ) und der Schweif ( $p=0,008$ ). Der Vergleich der Unterschiede zwischen der Verum- und der Placebogruppe war nicht signifikant. Auch die anderen Regionen wiesen keine signifikanten Unterschiede auf.

Knapp ein Viertel (9/37) der 37 Besitzer gaben an, neben der Insol-bzw. Placeboimpfung im Untersuchungsjahr noch andere Maßnahmen bzw. Therapien angewandt zu haben. Hier waren neben der Ekzemerdecke (4/9 Pferden) und Lotionen bzw. Cremes (4/9) noch Homöopathika und Ceterizin vertreten. Ein Pferd wurde außerdem über den Sommer statt im Offenstall in einer Box gehalten.

#### 4.4 Kotuntersuchung

Im Rahmen der Kotuntersuchung wurden insgesamt 48 Kotproben untersucht. Davon wurden 34 bei der Erstuntersuchung und 14 bei der Abschlussuntersuchung gesammelt.

Bei der Erstuntersuchung zeigten 41 Prozent (14/34) der Pferde aktuell keine Ausscheidung, bei 59 Prozent (20/34) der Pferde war eine Verwurmung nachweisbar. Diese ließ sich noch in stark ( $n=9$ ) und leicht verwurmt ( $n=11$ ) aufteilen.

Mit 85 Prozent (17/20) waren die Pferde im Winter am häufigsten mit Strongylyden befallen. Hierbei wiesen neun Pferde einen massenhaften und acht Pferde einen leichten Befall auf. Bei drei Pferden konnten Wurmeier von *Anaplocephala* und bei einem Tier Parascaris Eier nachgewiesen werden.

Bei der Abschlussuntersuchung lag der Verwurmungsstatus bei 86 Prozent ( $n=12$ ) der untersuchten Kotproben. Hierbei konnten bei allen verwurmten Pferden (12/14) Strongylyden, bei zwei Pferden noch zusätzlich *Anaplocephalaeier* nachgewiesen werden.

Nun wurde der Status der Wurmbürde sowohl mit dem Score, dem FIT als auch dem CAST des jeweiligen Untersuchungstages verglichen. Beim Vergleich des Grades der Verwurmung und dem Score sowie dem CAST-Ergebnis der Pferde bei der Erstuntersuchung konnte keine Korrelation festgestellt werden, ebenso wenig wie bei der Gegenüberstellung der Ausprägung der Verwurmung und der Höhe des FIT I (Tabelle 30). Im Gegenteil ging der Trend dahin, dass stark verwurmt Tiere einen signifikant niedrigeren FIT I aufwiesen ( $p=0,0324$ ) als leicht bzw. nicht verwurmt

Pferde. Ein falsch positives Ergebnis des Allergietests, ausgelöst durch eine starke Verwurmung des Tieres, konnte somit ausgeschlossen werden. Bei der Herbstuntersuchung ließ sich keine Korrelation zwischen dem Grad der Verwurmung, dem Score und den beiden Allergietests feststellen (Tabelle 31).

**Tabelle 30:** Vergleich des Verwurmungsgrads der Erst-US mit Score und FIT.

<u>Nr.</u>	<u>Wurmstatus I</u>	<u>Note Erst-US</u>	<u>Summe Punkte FIT I</u>
1	kein	2	5
2	kein	2	13
4	kein	1	11
5	leicht	3	7
7	stark	1	3
8	stark	1	11
9	leicht	1	nicht auswertbar
10	stark	1	4
11	kein	0	15
12	stark	0	19
13	kein	1	6,5
14	leicht	1	4,5
15	kein	1	4
18	kein	1	17
20	kein	2	5
22	kein	2	12
23	stark	2	14
25	stark	1	2
26	stark	1	0
27	leicht	3	6,5
28	leicht	0	5,5
29	kein	2	8
35	kein	0	13
36	kein	0	2
37	leicht	1	1
38	leicht	1	4
39	leicht	1	3
41	stark	1	0
42	leicht	0	1
44	kein	3	11
47	leicht	0	5
50	leicht	1	6,5
51	kein	2	12,5
53	stark	0	15

**Tabelle 31:** Vergleich des Verwurmungsgrads der Abschluss-US mit Score und FIT.

<u>Nr.</u>	<u>Wurmstatus II</u>	<u>Score AU</u>	<u>FIT II</u>
5	leicht	26	4
13	leicht	7	2
14	leicht	21	2
15	leicht	19	2
18	leicht	19	4,5
23	stark	27	2
25	stark	14	9
26	stark	8	2
28	leicht	8	3
29	kein	23	2
35	stark	7	4,5
39	stark	27	1
47	leicht	1	nicht auswertbar
51	kein	25	11

## 5 Diskussion

Empirische Studien und Erfahrungsberichte praktizierender Tierärzte zeigten eine Verbesserung des klinischen Bildes bei an Sommerexzem erkrankten Pferden nach der Behandlung mit dem Pilzimpfstoff Insol® Dermatophyton. Ebenfalls berichtete STEIDLE (2009) von einem hochsignifikanten Unterschied des Befalls mit Dermatophyten bei Pferden mit (52,8%) und ohne (22,2%) Disposition für das Sommerexzem. DRONOV und ROHWER (2007) testeten den Einfluss von ID auf equine Leukozyten in-vitro und konnten einen immunmodulatorischen Effekt durch ID nachweisen. Des Weiteren gibt es bis heute keine befriedigenden Behandlungsvorschläge für das Sommerexzem. Der Einsatz von immunsuppressiven Corticosteroiden bringt nur zeitlich begrenzte Erfolge und ist aufgrund der Gefahr von Nebenwirkungen wie Hufrehe oder Infektanfälligkeit begrenzt (UNGEMACH in LÖSCHER et al. 2003). Die Spezifische Immunotherapie (SIT) als bislang einzige kausale Therapie hat das Ziel der Hyposensibilisierung des betroffenen Individuums gegenüber bestimmten Allergenen durch die serielle Verabreichung hochreiner Allergene (WESTRITSCHNIG 2002). Da bisher jedoch für die SIT gegen das SE nur grobe Extrakte zur Verfügung stehen, waren die Erfolge bis dato begrenzt und stark schwankend (BARBET et al. 1990; ANDERSON et al. 1996). So schien es sinnvoll die in-vivo Wirksamkeit von Insol® Dermatophyton bei Pferden mit Disposition für das Sommerexzem im prophylaktischen Einsatz zur Umstimmung des Immunsystems mit der Erwartung einer Milderung bzw. Vermeidung einer klinischen Erkrankung zu testen.

### 5.1 Material und Methode

#### 5.1.1 Auswahlkriterien

Die Auswahl der Patienten erfolgte nach folgenden Kriterien: Rasse, Alter, Dauer der Erkrankung, Regionalität und keine Vorbehandlung mittels Glucocorticoiden in den letzten drei Monaten vor Studienbeginn.

Die Gründe hierfür waren, dass das SE schon lange nicht mehr nur auf das Islandpferd beschränkt ist, sondern mittlerweile Pferde aller Rassen betroffen sind. Daher sollte die Gruppe Pferde unterschiedlichster Rassen enthalten.

Empirische Studien in der Vergangenheit haben zudem gezeigt, dass die Behandlung mit ID v.a. bei Pferden anschluss, die maximal zwei Jahre an SE erkrankt waren/seit maximal zwei Jahren Symptome zeigten (ROUNDTABLE zum Sonderdruck PFERDE

SPIEGEL 2002). Daher war dies ebenfalls ein wichtiges Auswahlkriterium für die Teilnahme an der Studie. Um gute statistische Ergebnisse zu erhalten, wurde vor Studienbeginn die notwendige Gruppengröße statistisch ermittelt. Diese lag bei 21 Pferden je Gruppe. Da der Zeitraum, in dem die Pferde ihre drei Impfungen bekommen mussten, durch die 14-Tage-Regelung relativ knapp war und auch die Allergietests nur Montag bis Mittwoch zum Labor eingeschickt werden konnten, war der dritte Auswahlpunkt die Erreichbarkeit einer so großen Gruppe in dieser geringen Zeit. Daher mussten auch Tiere aufgenommen werden, welche bereits länger als zwei Jahre Symptome zeigten (Definition Altekzemer).

Da vermutet wird, dass ID auf das Immunsystem der Pferde Einfluss hat, durften die teilnehmenden Pferde die letzten drei Monate vor Studienbeginn nicht mit Cortison vorbehandelt worden sein, um die Ergebnisse nicht zu verfälschen.

### 5.1.2 Allergietests

Für die Diagnostik wurden die beiden gebräuchlichen in-vitro Tests FIT und CAST ausgewählt. Beide sind in Deutschland etabliert und erhältlich. Der FIT testet neben den Sommerekzem-auslösenden Insekten noch weitere kreuzreagierende, die die Genauigkeit des Tests erhöhen (GEIBEN 2003; MORRIS und LINDBORG 2003), und ist somit der Goldstandard in Deutschland. KOBELT (2001) fand heraus, dass der FIT auch in der allergiefreien Zeit (Winter) zuverlässige Ergebnisse liefert. Ebenfalls zu dem Ergebnis, dass sowohl CAST als auch FIT zur Diagnostik auch während der symptomfreien Zeit geeignet sind, kam STEIDLE (2009). Es gab jedoch bis heute keine Studie, die die beiden Tests vor und nach der Mückenflugperiode untersuchte und verglich. Dies sollte in dieser Studie mitberücksichtigt werden. Aufgrund der möglichen Spätreaktionen (72 h), sowie der ungenauen Testergebnisse und oft starker Divergenz der Ergebnisse des Intrakutantests mit der tatsächlichen Klinik (KOLM-STARK und WAGNER 2002; LEBIS et al. 2002) wurden die beiden in-vitro Tests FIT und CAST dem Intrakutantest in dieser Arbeit vorgezogen.

### 5.1.3 Zytokine

Die Auswahl der zu untersuchenden Zytokine orientierte sich an den Untersuchungen von DRONOV und ROHWER (2007). Diese untersuchten die immunmodulatorische Wirkung von ID in-vitro mittels der Schlüsselzytokine IFN $\gamma$ , IL-4 und IL-10 sowie dem der Th1-Immunantwort zugeordnetem TNF $\alpha$ . Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit noch das Th1-Zytokin IL-1 untersucht. Dieses eigentlich als pyrogenes Zytokin

bekannte Interleukin wird gerade in der Humanmedizin immer mehr mit diversen Allergieformen (Kontaktdermatitis, Asthma, atopische Dermatitis) in Verbindung gebracht (KRAUSE et al. 2012). Es sollte daher untersucht werden ob IL-1, auch in der Veterinärmedizin, ein aussagekräftiger Parameter zur Darstellung einer Allergie allgemein und im speziellen zur Darstellung der immunmodulatorischen Wirkung von ID ist.

## 5.2 Ergebnisse

### 5.2.1 Score/Therapieerfolg

BRÜNNLEIN (2001) konnte in ihren Untersuchungen zum Sommerexzem keinen dauerhaften und zuverlässigen Einfluss von Insol® Dermatophyton auf die generelle oder *Culicoides*-spezifische Sensibilisierung nachweisen. Ebenso war kein befriedigender Erfolg mit dem Immunmodulator Baypamun N® nachzuweisen (GEIBEN 2003). GREMMES (2002) dahingegen berichtete von einer guten Therapierate bei der prophylaktischen Impfung mit ID in einer retrospektiven Studie eines Patientenpools von 52 Pferden. Ebenso erzielte STEIDLE (2009) gute Erfolge mit den homöopathischen Mitteln Engystol® ad.us.vet. und Traumeel® ad.us.vet, wobei eine Wirkung auf die peripheren Lymphozyten nachgewiesen werden konnte. Die Schnittmenge der Beobachtungen von BRÜNNLEIN (2001) und GREMMES (2002) ließen sich weitgehend auch im Rahmen dieser Studie nachweisen. So war zwar bei der prophylaktischen Behandlung mit Insol® Dermatophyton eine teilweise Besserung der Pferde, v.a. der Jungekezemer, wie es auch GREMMES (2002) berichtete, zu beobachten. Diese war aber eher auf das Einzelindividuum beschränkt und daher nicht als allgemein gültig anzusehen. Bei einigen Pferden der Verumgruppe ließ sich zwar laut den Besitzern eine Verbesserung der Symptomatik des Sommerexzems im Vergleich zum Vorjahr feststellen, die aber im Vergleich mit der Placebogruppe statistisch nicht signifikant war. Des Weiteren waren ebenfalls Einzeltiere aus der Placebogruppe deutlich besser/ zeigten weniger klinische Symptomatik des Sommerexzems als im Vorjahr. Hierbei stach in beiden Gruppen je ein Pferd deutlich hervor. In der Verumgruppe zeigte Pferd Nummer 13 (6 jähriger Bayernwallach, seit 3 Jahren Symptome) bis auf geringgradiges Schweifscheuern keine Symptome nach der Behandlung und konnte das erste Mal ohne Ekzemerdecke gehalten werden. In der Placebogruppe war dies Pferd Nummer 11 (5 jähriger Ponywallach, Jungekezemer), der unter der Placebobehandlung so gut wie symptomfrei war.

Ein möglicher Grund hierfür könnten die klimatischen Bedingungen des Untersuchungsjahres und eine daher veränderte (eventuell niedrigere) Insektenbelastung als im Vorjahr darstellen. Da die Temperaturen im Behandlungsjahr mit Ausnahme der Monate Juni, Juli und November deutlich höher waren als im Jahr zuvor ([www.dwd.de](http://www.dwd.de) Stand: August 2014) ist wohl eher nicht von einer verminderten Insektenbelastung im Untersuchungsjahr auszugehen. Hierbei wären weiterführende Studien mit Einbeziehung der klimatischen Werte und der letztendlich daraus resultierenden Insektenbelastung hilfreich. Zum anderen bleibt zu prüfen, ob die als Placebo verwendete Nährlösung (0,04mg/ml Thiomersal, Glucose, Fleischextrakt, Wasser für Injektionszwecke) des ID (ohne die im ID enthaltenen Pilzkulturen) ebenfalls einen positiven Einfluss auf das Immunsystem von Sommerkezemkranken Pferden hat. Dies wäre ein weiterer möglicher Erklärungsgrund für die deutliche Verbesserung der Symptomatik bei Einzeltieren aus der Placebogruppe. Hierfür wären weitere Studien und Grundlagenforschung nötig.

Das in dieser Studie verwendete klinische Score-System wurde, in Orientierung an den von OLIVRY et al. (2006) entwickelten und etablierten „Canine Atopic Dermatitis Exent and Severity Index“ (CADESI) für Hunde, extra für diese Studie ausgearbeitet und erstellt. Dieser beurteilte den Schweregrad der atopischen Dermatitis beim Hund. Hierbei wurden vier Kardinalsymptome der caninen atopischen Dermatitis an 62 Körperstellen untersucht und mit den Schweregraden „0“ = keine Symptome bis „5“ = schwerste Symptome/Ausprägung beurteilt. GEIBEN (2003) verwendete in ihrer Studie zur Beurteilung der Schweregrade der Sommerkezemausprägung ebenfalls ein dafür entwickeltes Score-System. Dieses unterschied sich in dem hier angewandten und für diese Studie entwickelten in folgenden Punkten: die beschriebenen elf Regionen wurden durch eine zwölfte (Vorderbrust) ergänzt. Dies ergab sich aus der tatsächlichen klinischen Ausprägung der Symptome der Patienten, bei denen diese Region sehr häufig und stark befallen war. Im Gegenzug dazu wurden die Symptome von den von GEIBEN (2003) beschriebenen sieben (Quaddelbildung, Haarbruch, Alopezie, Krusten- und Borkenbildung, nässende Hautveränderungen, durchtrennte Cutis, eitrig infizierte Wunden) auf fünf (Haarbruch, Alopezie, blutig/eitrig Hautveränderungen, Hautverdickung, Schuppen) eingeschränkt bzw. ergänzt/ausgetauscht (Hautverdickung, Schuppen). Diese deckten alle vorkommenden Veränderungen ausreichend ab, bzw. ermöglichten durch die Ergänzung der Symptome „Schuppen“ und „Hautverdickung“ eine genaue und individuelle Ermittlung des Scores auch in den Wintermonaten und somit der Erstuntersuchung in dieser Studie, wo keines der Pferde blutige oder eitrig Hautveränderungen zeigte. Es war

jedoch möglich eine hochsignifikante Korrelation der Noten der Erstuntersuchung mit den Noten der Folgeuntersuchungen im Sommer und Herbst nachzuweisen. Somit stellte das Scoring der Pferde mit den hier verwendeten Symptomen eine gute und sichere Einschätzung der Schwere der Erkrankung zu jeder Jahreszeit dar.

Um eine noch genauere Unterteilung der Schweregrade zu bekommen wurde statt der bisher meist verwendeten Einteilung von null bis drei (0= keine, 1= geringgradig, 2= mittelgradig, 3= höchstgradig) die Einteilung null bis fünf gewählt. Hierbei wurden der Termination mittel- bzw. höchstgradig je 2 Stufen zugeteilt (mgr. = 2/3; hgr. = 4/5). Diese sechsstufige Einteilung des Score-Systems hat sich in der Kleintierdermatologie bereits bewährt und eingebürgert (OLIVRY et al. 2006). Vergleich man den Gesamtscore eines Pferdes mit der entsprechenden Gesamtnote eines Untersuchungszeitpunkts, so fiel auf, dass Pferde mit der Höchstnote „fünf“ teilweise einen vergleichsweise niedrigen Score in Bezug zur maximalen Gesamtpunktezahl aufwiesen. Dies lag daran, dass alle Regionen und Symptome gleich beurteilt wurden, d.h. es wurde davon ausgegangen, dass der Schweregrad aller Regionen und Symptome als gleich einzustufen ist. War aber eine Region wenig befallen oder ein Symptom zu einem Untersuchungszeitpunkt (z.B. Schuppen im Sommer) weniger vertreten, so wurde der Gesamtscore, trotz hochgradiger Ausprägung der Erkrankung, verhältnismäßig niedrig. Um dies auszugleichen und ein noch repräsentativeres Ergebnis des aktuellen Krankheitszustands zu bekommen, wurde daher zusätzlich der Gesamt-status-quo (Gesamtnote) je Untersuchung bestimmt. Für Studien, die sich rein auf die Beurteilung der Ausprägung der Erkrankung/Schweregrade beziehen, wäre es daher unter Umständen vorteilhaft, die Regionen bzw. Symptome nach der Häufigkeit des Auftretens bzw. der Schwere der Symptome (blutige Veränderungen wären z.B. schwergewichtiger als Schuppen zu beurteilen) mit einem zusätzlichen Graduierungsfaktor zu versehen, um den tatsächlichen Schweregrad der Erkrankung des Individuums besser dem maximalen Score anzupassen.

### 5.2.2 Allergietests

Bis heute ist das Sommerekzem des Pferdes ein großes wirtschaftliches Problem, v.a. für die isländischen Pferdezüchter, da es für diese Erkrankung keine befriedigenden Behandlungsvorschlägen gibt. So wird die Erkrankungshäufigkeit für aus Island importierte Tiere auf fast 25 Prozent geschätzt (UNKEL1985), bzw. in neueren Berichten bis hin zu 70 Prozent (RÜSBÜLDT 1997). Doch schon seit längerem ist die Erkrankung nicht mehr nur als „typische Islandpferdkrankheit“ auf diese Rasse beschränkt, sondern weitet sich auf beinahe alle Rassen, Geschlechter und Farben

aus. Umso wichtiger ist es, diese Erkrankung zu erkennen und zu diagnostizieren, auch aus forensischer Sicht, besonders auch in der symptomfreien Zeit. So machten MARTI et al. (1999) den Anfang, indem sie zeigten, dass bei Pferden mit Disposition für das SE nach Stimulation mit einem Extrakt aus *Culicoides nubeculosis* eine signifikant erhöhte Sulphidoleukotrien-Freisetzung aus isolierten basophilen Leukozyten resultierte. Dies konnte in einer Meta-Analyse von DE WECK und SANZ (2004) bestätigt werden. Ebenfalls gelang es KAUL (1998) mit dem FIT einen geeigneten Histamine-Release-Test (HRT) zur Feststellung des SE zu erstellen. Dies wurde durch KOBELT (2001) bestätigt. KOBELT fand des Weiteren heraus, dass der FIT auch in der allergenfreien Zeit (Winter), zuverlässige Ergebnisse lieferte. Ebenfalls zu dem Ergebnis, dass sowohl CAST als auch FIT zur Diagnostik auch während der symptomfreien Zeit geeignet sind, kam STEIDLE (2009). Sie zeigte, dass im FIT bei symptomfreien Pferden mit Disposition für SE die Histaminfreisetzung nach Stimualtion mit *Culicoides*-Extrakt deutlich höher war als bei einer gesunden Vergleichsgruppe. Ebenfalls zeigte sie, dass im CAST, bei erkrankten aber symptomfreien Pferden, nach entsprechender Stimulation eine signifikant höhere Menge an sLT ausgeschüttet wurde als bei der gesunden Vergleichsgruppe.

In dieser Studie wurden bei 51, seit mindestens einer Saison an SE erkrankten Pferden sowohl vor Beginn des Insektenflugs und somit der Allergendisposition (Februar) als auch am Ende bzw. nach der Saison (November) parallel FIT und CAST durchgeführt und die Ergebnisse verglichen. Hierbei zeigten die beiden Tests bei der Erstuntersuchung im Februar (FIT I und CAST I) im Vergleich durchweg ähnliche Ergebnisse hinsichtlich der Reaktion und der Häufigkeit auf die in beiden Tests getesteten Insekten. Jedoch war der FIT mit nur zwei falsch negativ getesteten Tieren, im Vergleich zum CAST mit sieben falsch negativ getesteten Pferden, der Test mit der deutlich höheren Treffsicherheit, da es sich bei den Studienpferden ja um Tiere handelte, die seit mindestens einem Jahr Sommerrekzemsymptomatik zeigten. Im Herbst allerdings unterschieden sich die Tests deutlich in der Anzahl und Reihung der Insekten. Auch bei der Abschlussuntersuchung (FIT II und CAST II) war der FIT mit nur einem falsch negativen Pferd, im Gegensatz zum CAST mit 13, noch deutlich treffsicherer. Somit ließ sich die Aussage von DE WECK und SANZ (2004) - Histamin Release Test (FIT) und der CAST korrelieren relativ gut ( $r=0,4$  bis  $0,6$ ) – nur bedingt nachweisen. Dies traf zwar noch weitgehend auf die Testreihe vor Beginn der Saison zu, am Ende der Saison unterschieden sich die Ergebnisse der beiden Tests allerdings deutlich. Filterte man jedoch aus dem FIT die im CAST nicht getesteten (Kreuz-) Allergene heraus, so änderte sich das Ergebnis deutlich. So waren nun beim FIT I,

ebenso wie beim CAST I, je sieben Tiere falsch negativ, beim FIT II waren in dieser Konstellation zwei statt einem Pferd falsch negativ. Dies zeigte, dass die im FIT getesteten, primär nicht am Sommerekzem-Komplex beteiligten Insekten (Motte, Eintagsfliege, Hausfliege) und der ebenfalls getestete Wadenstecher mit ihren kreuzreagierenden Allergenen immens zur höheren Sensitivität und somit Treffersicherheit des FIT im Vergleich zum CAST beitrugen. Dies bestätigt die Aussage der Immunologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover auf ihren Befundmitteilungen. So wird hier erklärt, dass die Allergene von Insekten, die vermutlich keine direkten Verursacher der Symptome sind (z.B. Motte o. Eintagsfliege) kreuzreagierende Allergene gegen hiesige allergieauslösende Insekten enthalten und somit zur Verbesserung der Diagnostik mituntersucht werden, solange keine definierten Allergene verfügbar sind. Es zeigte sich zudem eine mangelnde Korrelation von Sensibilisierungsgrad gegen *Culicoides nubeculosus* und dem Grad der klinischen Ausprägung. Dies zeigt, dass nicht nur *Culicoides nubeculosus*, sondern auch andere Insekten das Vollbild des Sommerekzems auslösen können. Daher macht es Sinn, bei Sommerekzemen nicht nur die Sensibilisierung gegen *Culicoides* sondern auch gegen andere Insekten im FIT oder CAST zu prüfen. Sie widerspricht der in Literatur und Volksmund geäußerten Dominanz von *Culicoides* als „der“ Ursache für das Sommerekzem bei Pferden. Gegen eine einzige oder nur sehr wenige allergieauslösende –und damit pathogenetisch relevante Allergene produzierende– Insektenarten sprechen auch die sehr unterschiedlichen klinischen Ausprägungen und Verlaufsformen des Sommerekzems, die sich auch sehr deutlich in dieser Studie zeigten. Klinisch gesunde wie auch an Sommerekzem erkrankte Pferde zeigten im Intrakutantest wie auch im in-vitro-Test häufig Reaktionen mit Extrakten aus der nicht haemotophagen Eintagsfliege und der ebenfalls nicht blutsaugenden, in Nordamerika heimischen Feuerameise (GEIBEN 2003; MORRIS und LINDBORG 2003). Dies ließ sich auch in dieser Studie bestätigen. So war beim FIT I die Motte, als nicht blutsaugendes Insekt, mit über 80 Prozent das Insekt, auf das die meisten Pferde positiv reagierten. Ebenfalls sprachen fast 60 Prozent der Tiere beim FIT I auf die Eintagsfliege mit einer allergischen Reaktionsbereitschaft an.

Interessant war auch die Punkteverteilung (und somit Einteilung der Schweregrade) des FIT im Vergleich der beiden Untersuchungen. Hierbei zeigten die Pferde beim FIT I, in der symptomfreien Zeit, eine signifikant höhere durchschnittliche Punktezahl als beim FIT II, unmittelbar nach der Saison. Es wäre zu erwarten gewesen, dass die Tiere nach direktem Allergenkontakt unmittelbar nach der Saison gegebenenfalls stärker reagierten als nach einer monatelangen Ruhephase. Dieser Effekt war in beiden

Gruppen (Verum und Placebo) in gleichem Maße anzutreffen. Es ließ sich daher annähernd ausschließen, dass dies etwas mit der hier verwendeten Insol® Dermatophyton Impfung zu tun hatte. Wichtig bleibt zu erwähnen, dass dieselben Pferde in beiden Tests teilweise sehr unterschiedlich reagierten. Ähnliches konnte auch GEIBEN (2003) in ihrer Studie zum Sommerkzem beobachten. Sie berichtete von einer zweijährigen placobobehandelten Islandstute mit deutlichen klinischen Symptomen des Sommerkzems, deren Sensibilisierungsgrad gegen *Culicoides nubeculosus* während der Saison drastisch abfiel, bis schließlich am Saisonende keine Reaktionsbereitschaft gegen *Culicoides nubeculosus* mehr vorhanden war. Ähnliches konnte auch KOBELT (2001) bei Islandpferden beobachten.

Des Weiteren bestand keine Korrelation zwischen der Höhe des FIT und der tatsächlichen klinischen Ausprägung. Es darf daher keine Aussage über den Schweregrad der Erkrankung bezüglich der Höhe der Allergiebereitschaft im Allergietest getroffen werden. Dies ist sicherlich auch aus forensischer Hinsicht, in Bezug auf Ankaufsuntersuchungen, interessant. Hierbei ermöglicht der FIT zwar auch in der symptomfreien Zeit eine sehr sensitive Aussage bezüglich der Allergiebereitschaft des getesteten Pferdes, wodurch eine sehr sichere Aussage hinsichtlich sommerkzempositiv oder –negativ getroffen werden kann. Er vermag aber nicht aufgrund der Höhe des Testergebnisses auf die tatsächliche klinische Ausprägung während der klinisch manifesten Periode zu schließen. Das heißt, Pferde mit niedriger FIT Punktezahl können im Sommer mit hochgradigen Symptomen reagieren, ebenso vice versa.

Der CAST zeigte im Vergleich zum FIT die höhere Laborsicherheit. So waren bei den Tests im Februar beim FIT die Blutproben von drei Pferden, im CAST von zwei nicht auswertbar. Bei den Folgetests im November waren beim CAST alle Proben auswertbar, beim FIT eine nicht. Dies bedeutet für den Tierarzt und Pferdebesitzer einen deutlichen Mehraufwand an Zeit und Kosten, da die Blutproben für den FIT privat per Overnight Express nach Hannover geschickt werden müssen, wohingegen der CAST per laboreigenem Kurier zusammen mit anderen Proben abgeholt wird.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der FIT - momentan in Deutschland der Goldstandard zur Identifizierung von an Sommerkzem erkrankten Pferden - dieser Rolle durch die doch deutlich höhere Treffsicherheit auch in dieser Studie gerecht wurde. Für einen einfachen reaktiven Nachweis, ohne forensischen Hintergrund, ist der CAST durch die einfachere und kostengünstigere Abhandlung (laboreigener Kurier, kein Versand per Overnight Express) aber eine gute Alternative für den Praktiker. Um die beiden Tests allerdings in ihrer Sensitivität und Spezifität zu vergleichen, wäre eine

gesunde Kontrollgruppe nötig gewesen. Dies war nicht Teil dieser Studie, sollte aber in weiterführenden Studien berücksichtigt werden.

### 5.2.3 Zytokine

DRONOV und ROHWER (2007) testeten den Einfluss von ID auf equine Leukozyten in-vitro und stellten fest, dass unter dem Einfluss von ID eine immunmodulatorische Wirkung erreicht wird.

So wurde unter dem Einfluss von ID die Expression der Th1-Zytokine verstärkt, wohingegen IL-4 als Th2-Zytokin kaum, dafür jedoch IL-10 produziert wurde. Dadurch wird die Reaktionslage des Organismus von Allergie (Th2) zu mehr Toleranz (Th1) verschoben. Dieses Phänomen wird sich in der immunmodulatorischen Therapie zunutze gemacht. So untersuchten AKDIS (2007) die Immunmodulation durch ASIT (Allergenspezifische Immuntherapie) beim Menschen und stellten fest, dass hierbei das Verhältnis von Th1- zu Th2-Zellen ansteigt, ebenso wie die Konzentration von IL-10 und TGF $\beta$ . Auch konnten sie eine Anergie der allergenspezifischen Zellen unter der ASIT-Behandlung zeigen. KEPPEL et al. (2008) untersuchten dies in einer Studie zur atopischen Dermatitis des Hundes und konnten ebenfalls einen Anstieg von IL-10 nachweisen. Dieser korrelierte mit dem Behandlungserfolg.

Diese Beobachtungen lassen sich auch in der vorliegenden Studie weitgehend bestätigen. Hierbei wurden die Leitzytokine der Th1- (IFN $\gamma$ ) bzw. Th2- (IL-4) Immunantwort sowie die ebenfalls wichtigen Schlüsselzytokine TNF $\alpha$  und IL-10, sowie das in der Humanmedizin immer mehr an Bedeutung gewinnende IL-1 zu je fünf Untersuchungszeitpunkten (im Rahmen der drei Impfungen der Zwischen- und der Abschlussuntersuchung) im Laufe des Studienjahres an den mit ID geimpften Pferden und der Placebogruppe untersucht.

KRAUSE et al. (2012) fassten in ihrer Studie das Verhalten von IL-1 bei verschiedenen humanen Autoimmunerkrankungen und allergischen Reaktionen zusammen. Dabei wurde in verschiedenen Mausmodellen von NAKAE et al. (2003) und SCHMITZ et al. (2003) ein großer Einfluss von IL-1 bei der Produktion Th2-spezifischer Zytokine beim bronchialen Asthma festgestellt. Da dies auch eine allergische Reaktion vom Typ 1 und 4 darstellt, war es naheliegend dieses Zytokin im Rahmen dieser Studie zu untersuchen und eventuelle Zusammenhänge zu erschließen.

In der vorliegenden Arbeit war der Verlauf von IL-1 in beiden Gruppen annähernd gleich, allerdings mit stärkerer Ausprägung (höheren Zytokinkonzentrationen) in der Verumgruppe. Daher kann angenommen werden, dass sich dieser Wert saisonal veränderte und durch die Impfung die Unterschiede deutlicher zur Geltung kamen.

Durch das Fehlen eines wirklichen Unterschieds der beiden Gruppen ist dieses Zytokin wohl weniger geeignet, um eine Immunmodulation bzw. das Ansprechen des Immunsystems auf eine Aktion zu beurteilen. Allerdings eignet es sich durchaus, allgemeine Aussagen über den saisonalen Verlauf einer allergischen Reaktion darzustellen. Hierfür wären weitere Studien mit anderen allergischen Geschehen (z.B. COB) interessant um zu sehen, ob die hier gefundenen Ergebnisse sich auch auf andere Krankheitsverläufe beim Pferd verallgemeinern lassen.

Wie von DRONOV und ROHWER (2007) beobachtet, stiegen auch in der hier vorliegenden Studie die Werte von IL-10, TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  an. Diese Effekte waren Großteils in der Verumgruppe signifikant und bestätigten den immunmodulatorischen Effekt von ID von Allergie (Th2-Immunantwort) zu mehr Toleranz (Th1-Immunantwort). Im Gegensatz dazu war bei der Untersuchung des Th2-Zytokins IL-4 kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen erkennbar. Jedoch ließ sich in der klinischen Ausprägung kein signifikanter Unterschied zwischen der Verum- und der Placebogruppe nachweisen. Dies lässt sich am wahrscheinlichsten damit erklären, dass der immunmodulatorische Effekt zwar auf hämatogener Ebene nachweisbar ist, jedoch zu gering um einen sichtbaren Effekt im Organismus zu bewirken. Hierzu wären weiterführende Studien mit z.B. einer veränderten bzw. angepassten Rezeptur von Insol® Dermatophyton nötig.

Für die Errechnung der Zytokinkonzentrationen aus den O.D. Werten wurde zunächst nach Herstellerangaben vorgegangen. Dieser empfiehlt für die Umrechnung die Verwendung ein „4-PL curve“ oder aber für jedes Zytokin eine eigene Standardkurve zu errechnen. Die „4-PL curve“ brachte aber sehr ungenaue und nicht zufriedenstellende Kurven und Ergebnisse. Daher wurden im Anschluss daran andere Formeln zur Umrechnung der O.D. Werte in die tatsächlichen Konzentrationen getestet. Hierbei lieferten die beiden Gleichungen „two phase decay“ bzw. „polynomial“ die besten Ergebnisse, mit denen schließlich auch gearbeitet wurde. Somit konnten gute und genaue Konzentrationen errechnet werden.

Beim Auswerten der Daten der Zytokinbestimmung fiel primär auf, dass sehr viele Tiere, unabhängig der Gruppenzuordnung (Verum oder Placebo) und des Untersuchungszeitpunktes, Werte aufwiesen, die deutlich über der höchsten Standardkonzentration lagen. Am deutlichsten war dies bei dem Th2-Zytokin IL-4, aber auch die Werte der Th1-Zytokine TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  lieferten einen hohen Anteil an Konzentrationen oberhalb der vom Hersteller angegebenen Nachweisgrenze. Die Serumproben der Pferde mit zu hohen Werten wurden im Anschluss *lege artis* verdünnt und schließlich rückgerechnet. Hierbei kamen allerdings, auch nach

mehrfachen Kontrolldurchgängen, weder replizierbare noch in einer sinnvollen Größenordnung liegende Werte heraus. Daraufhin wurden diese Werte durch einen fiktiven, oberhalb der Konzentration des höchsten Standards liegenden, Wert ersetzt. Dies könnte erklären, warum im Gegensatz zu der Studie von DRONOV und ROHWER (2007) der Abfall der IL-4 Konzentrationen nicht nachgewiesen werden konnte, da hier beinahe alle Werte der Probanden zu allen Untersuchungszeitpunkten über dem vom Hersteller angegebenen höchsten Standardwert lagen. Da dieses Problem in parallel zu dieser Studie durchgeführten anderen Untersuchungen auch auftrat, wären hier weiterführende Nachforschungen angebracht, um genaue, sinnvolle und reproduzierbare Konzentrationen zu erlangen, bzw. um herauszufinden, ob es grundsätzlich nicht möglich ist auf  $-80^{\circ}\text{C}$  gefrorene Serumproben zu verdünnen. Des Weiteren wäre eventuell von Seiten der Herstellerfirma zu überdenken, die Standardkonzentrationen für die betroffenen Zytokine grundsätzlich zu erhöhen.

#### 5.2.4 Effekt der Insol® Dermatophyton Behandlung im Vergleich zum Vorjahr

Um einen noch genaueren Eindruck der Wirkung des ID zu bekommen, wurden die Besitzer der Pferde zur Ausprägung/zu dem Schweregrad der Symptome aus ihrer Sicht im Behandlungsjahr und im Vorjahr befragt. Die Ergebnisse dieser Befragung waren recht interessant. So war in der Placebogruppe der durchschnittliche Beginn der Erkrankung im Behandlungsjahr signifikant einen Monat später und die Dauer ebenfalls signifikant einen Monat kürzer als im Vorjahr. Dies könnte unter anderem an den klimatischen Bedingungen des Behandlungsjahres gelegen haben. Da die Gruppen aber zufällig eingeteilt wurden und sich in allen Tourbezirken sowohl mehrere Verum- als auch Placebopferde befanden, kann dies wohl vernachlässigt werden. Dies bestätigt auch die Wetterdatenanalyse des Deutschen Wetterdienstes/Ministerium für Verkehr und digitale Infrastruktur. In ihrer Jahresauswertung der monatlichen Durchschnittstemperatur in Bayern lag diese im Vergleich des Untersuchungszeitraums (Februar bis November 2011) des Untersuchungsjahres mit Ausnahme der Monate Juni (annähernd gleiche Temperatur), Juli und November deutlich über den Vergleichswerten des Vorjahres ([www.dwd.de](http://www.dwd.de) Stand: August 2014). Eine weitere Möglichkeit wäre, dass auch die als Placebo verwendete Nährlösung des ID (Thiomersal, Glucose, Fleischextrakt, Wasser für Injektionszwecke) Effekte auf den Organismus vornimmt. Hierfür wären weitere Untersuchungen notwendig, da in der Humanmedizin das als Konservierungsstoff in Arzneimitteln eingesetzte Thiomersal die gegenteilige Wirkung zeigt und häufig zu Hauterkrankungen/Ekzemen führt (SCHNUCH et al. 1997). Im Gegenzug dazu gaben die Besitzer der Verumpferde eine signifikante

Besserung der Symptome im Untersuchungsjahr im Vergleich zum Vorjahr an, während die Tiere der Placebogruppe im Gesamtdurchschnitt gleich blieben. Auch hier könnte die Insektenbelastung der beiden Jahre eine entscheidende Rolle spielen, ist aber wie oben bereits erwähnt wahrscheinlich zu vernachlässigen, da teilweise in einem Stall sowohl Verum- als auch Placebotiere untersucht wurden. Da die Besitzer nur ihr Einzeltier beobachteten, könnte hier die Wirkung des ID besser zur Geltung kommen als beim Betrachten der Gesamtgruppe. Dies würde auch die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigen, dass Einzeltiere durchaus Verbesserungen der klinischen Symptomatik des Sommerkzems zeigten, dies aber im Betracht der Gesamtgruppe zu gering war um statistisch signifikant zu sein. So deckten sich die positiven Beobachtungen von GREMMES (2002) zur ID Impfung bei 52 an Sommerkzem erkrankten Pferden wenigstens zum Teil mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit.

#### 5.2.5 Kotuntersuchung

Im Rahmen der drei Impftermine und der Abschlussuntersuchung wurden, soweit möglich, von einigen Pferden Kotproben gesammelt und auf Parasiten untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchung wurden schließlich mit den beiden durchgeführten Allergietests und dem Score der Pferde verglichen, um eine eventuell bestehende Korrelation zwischen dem aktuellen Wurmstatus der Patienten und den Ergebnissen der Tests darstellen zu können. Hier zeigten in der Vergangenheit v.a. Studien aus der Humanmedizin, dass in Entwicklungsländern mit starker Helmintheninfektionsprävalenz allergische Erkrankungen bei weitem nicht so bekannt sind, wie in Industrieländern (BELL 1996; COOKSON und MOFFAT 1997). Beim Vergleich der Ergebnisse der Kotuntersuchung der Pferde mit den zeitgleich durchgeführten Allergietests konnte keine positive Korrelation zwischen dem Schweregrad des FIT, den Ergebnissen des CAST oder den Score Werten und dem Schweregrad der Verwurmung festgestellt werden. Der Trend im FIT ging jedoch, wie auch in der humanmedizinischen Studien, so weit, dass stark verwurmt Pferde einen signifikant niedrigeren FIT im Vergleich zu nicht/leicht verwurmt Tieren zeigten. Dies würde sich damit erklären lassen, dass das Immunsystem mit dem Verwurmungsstatus der Pferde beschäftigt war und daher weniger auf das allergische Geschehen reagieren konnte. Ähnliches vermutete KOBELT (2001). Sie stellte in ihrer Studie bei einigen Islandpferden einen Abfall der Reaktionsbereitschaft auf *Culicoides nubeculosus* während der Sommermonate fest und begründete dies wie folgt:

In der warmen Jahreszeit treffen die Tiere auf eine Vielzahl verschiedenster Antigene, auf die sie mit der Bildung von Antikörpern reagieren (z.B. vermehrte Wurmbelastung oder andere Insekten). Werden im Verlauf einer solchen Immunantwort Immunglobuline anderer Spezifität gebildet, die sich nun vermehrt an die geeigneten Fc-Rezeptoren der Mastzellen und basophilen Granulozyten binden, so können sie diejenigen Antikörper dort verdrängen, die *Culicoides*-Antigene erkennen. Die Erklärungsmöglichkeit für den Abfall der Reaktionsbereitschaft der basophilen Granulozyten gegenüber *Culicoides* liegt darin, dass die einzelnen *Culicoides*-spezifischen Immunglobuline rein räumlich so weit voneinander getrennt werden – oder ganz von der Oberfläche der Basophilen verschwinden –, dass ein Überbrücken der Antikörper und dadurch ein Zusammenlagern der Fc-Rezeptoren durch *Culicoides*-Antigene nicht mehr möglich ist. Somit kommt es zu keiner Signaltransduktion und zu keiner Reaktion der Zelle (messbar in Form der Histaminausschüttung) in Anwesenheit der *Culicoides*-Antigene. Das Pferd reagiert nun bei einer Sensibilisierungsprüfung auf *Culicoides* im FIT negativ. Prinzipiell wäre dies möglich, wenn es sich nicht um IgE-Antikörper handelt. Aufgrund der sehr hohen Bindungsaffinität des Fcε-Rezeptor 1 scheint es unwahrscheinlich, dass eine solche Umverteilung des IgE-Besatzes alleine durch Dissoziation und erneute IgE Bindung mit anderer Spezifität stattfindet. Wahrscheinlicher sind zwei andere Mechanismen:

Die vermehrte Bildung sensibilisierender Antikörper anderer Spezifitäten bestücken neu gebildete basophile Granulozyten, sobald sie aus dem Knochenmark ins Blut gelangen und noch freie Fc-Rezeptoren haben. Alternativ oder ergänzend können die bereits vorhandenen basophilen Granulozyten vermehrt Fc-Rezeptoren exprimieren, mit denen sie nun die neuen sensibilisierenden Immunglobuline binden. Eine solche Hochregulation der Expression des Fcε-RI auf Mastzellen und basophilen Granulozyten infolge erhöhter Konzentrationen an Serum-IgE ist für den Menschen (MAC GLASHAN et al. 1998) und die Maus (LANTZ et al. 1997) beschrieben. Wenn nun weniger für *Culicoides* sensibilisierte Basophile und Mastzellen im Körper vorhanden sind, dürfte dieses Individuum auch in-vivo auf *Culicoides* nicht mehr mit einer allergischen Reaktion antworten. Zeigt es dennoch weiterhin klinische Symptome des Sommereczems, so spricht dies sehr dafür, dass nun andere Allergene – vermutlich von anderen Insekten - spezifische sensibilisierende Antikörper in ausreichender Dichte auf den Basophilen und Mastzellen vorfinden, diese zur Mediatorfreisetzung aktivieren und so die klinischen Symptome bedingen. Dies zeigt, dass einerseits nicht nur *Culicoides nubeculosus*, sondern auch andere Insekten das Vollbild des Sommereczems auslösen können. Daher macht es Sinn, bei Sommereczemern nicht nur die Sensibilisierung gegen *Culicoides* sondern auch gegen

andere Insekten im FIT oder CAST zu prüfen. Diese Empfehlung gibt auch die mangelnde Korrelation von Sensibilisierungsgrad gegen *Culicoides nubeculosus* und dem Grad der klinischen Ausprägung. Sie widerspricht der in Literatur und Volksmund geäußerten Dominanz von *Culicoides* als „der“ Ursache für das Sommerkezem bei Pferden. Um die tatsächliche Bedeutung einzelner Insektenarten für das Sommerkezem zu erfassen, sollten ihre Antigene vergleichend im FIT oder CAST zur individuellen Sensibilisierung geprüft und mit der Ausprägung sowie dem Verlauf der individuellen Symptome korreliert werden. Da der FIT sowie auch der CAST einerseits die aktuelle und funktionelle allergische Reaktionsfähigkeit für jedes einzelne potentielle Allergen empfindlich erfasst, ohne den Spender damit zu beeinflussen, stellen sie eine weiterführende analytische Ergänzung zur klinischen Beurteilung dar. Gegen eine einzige oder nur sehr wenige allergieauslösende – und damit pathogenetisch relevante Allergene produzierende – Insektenarten sprechen auch die sehr unterschiedlichen klinischen Ausprägungen und Verlaufsformen des Sommerkezems, die sich auch sehr deutlich in dem in dieser Studie untersuchten Patientenpool zeigten. Dass im Allgemeinen die Sensibilisierung gegen *Culicoides* allerdings erhalten bleibt und insbesondere auch im Winter, in der mückenfreien Jahreszeit Bestand hat, kann umgekehrt dadurch begründet werden, dass mit Ausbleiben der für die warme Jahreszeit postulierten erhöhten Antigenkonfrontation die Produktion der Immunglobuline eingestellt wird. Dies geschieht durch das Absterben der Plasmazellen, die nach ihrer vollständigen Differenzierung per se nur noch eine begrenzte Lebensdauer von ca. vier Wochen besitzen (JANEWAY und TRAVERS 2002). Diejenigen Plasmazellen jedoch, die allergenspezifisches IgE sezernieren, zeichnen sich durch eine längere Überlebenszeit aus. So wird weiterhin allergenspezifisches IgE produziert und jetzt mit nur wenig Konkurrenz an Fcε-Rezeptor tragende Zellen gebunden. KAUL (1998) berichtete von zwei vorberichtlich an Sommerkezem erkrankten, im FIT aber negativen Pferden, die nach zweimaliger Entwurmung trotz Stallhaltung und wenig Insektenkontakt plötzlich eine deutliche Sensibilisierung der Basophilen im FIT gegen *Culicoides nubeculosus* zeigten. Auch EDMONDS et al. (2001) untersuchten den Einfluss des Verwurmungsgrades von Ponys auf das Immunsystem/Zytokinproduktion und stellten fest, dass bei stark verwurmten Tiere ein geringerer IL-4 Spiegel messbar war als bei weniger stark verwurmt. Ebenso wurde der schützende Effekt von Helmintheninfektionen durch Immunmodulation wurde in diversen Mäuse-, Schweine- und Rinderversuchen weiter unterstützt (BASHIR et al. 2002, GRAHAM et al. 2001, HURST et al. 2006).

Um dies zu verifizieren wären aber weitere und ausführlichere Untersuchungen nötig. Es lässt sich aber festhalten, dass durch eine starke Verwurmung der Probanden kein „falsch positives“ Testergebnis zu erwarten ist.

.

## 6 Zusammenfassung

### Therapie des Sommerkezems mit Insol® Dermatophyton – eine Feldstudie

#### Magdalena Brunner

Primäres Ziel dieser Arbeit war es in einer Placebo kontrollierten Blindstudie den Einfluss von Insol® Dermatophyton (ID) an 51 mit Sommerkezem erkrankten Pferden zu testen. Dazu wurden die Tiere im Februar des Untersuchungsjahres dreimal im Abstand von je zwei Wochen mit ID (n=27) oder mit derselben Menge Placebo (n=24) geimpft. Des Weiteren wurde untersucht, ob sich durch die Behandlung mit ID immunmodulatorische Effekte nachweisen lassen. Hierfür wurden bei jeder Untersuchung der Pferde (insgesamt fünf Mal) Serumblutproben zur Auswertung spezifischer Zytokine (IL-1, IL-4, IL-10, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) entnommen. Als dritter Punkt wurden die beiden in-vitro Allergietests Funktioneller in-vitro Test (FIT) und Cellular Antigen Stimulation Test (CAST) vor und nach der Insektensaison durchgeführt und die Ergebnisse verglichen. Die Veränderungen des klinischen Bildes (Hautveränderungen, Juckreiz) wurden anhand eines speziell für diese Studie entwickelten Score-Systems vor (Februar), während (Juni) und nach (November) der Insektenperiode des Untersuchungsjahres beurteilt. Entsprechend den prinzipiell bekannten Prädilektionsstellen wurden 12 Körperregionen festgelegt, die auf je fünf Symptome (Haarbruch, Alopezie, blutige/eitrige Hautveränderungen, Hautverdickung, Schuppen) untersucht und mittels Punktevergabe von 0 (nicht vorhanden) bis 5 (hochgradig vorhanden) bewertet wurden. Aus der Summe dieser Punktzahlen war für jedes Tier und für jeden Zeitpunkt die klinische Ausprägung des Sommerkezems quantifizierbar. Das am häufigsten vorkommende Symptom war der Haarbruch, gefolgt von der Hautverdickung. Alle Symptome, mit Ausnahme der Schuppen, hatten ihren Höhepunkt im Sommer und ihren niedrigsten Wert bei der Erstuntersuchung im Winter. Beim Symptom Schuppen war dies genau umgekehrt. Die am stärksten befallene Region war der Hals, gefolgt von Schweif und Unterbauch. Die deutlichste Ausprägung der Erkrankung konnte im Sommer beobachtet werden, wohingegen im Winter die Symptome am wenigstens ausgeprägt waren. Es ließen sich jedoch von dem Score der Erstuntersuchung im Winter Rückschlüsse auf die Schwere der Erkrankung im Laufe der Saison ziehen. So waren Pferde mit einem hohen Score im Winter auch im Sommer deutlich schwerer betroffen als Pferde mit einem niedrigen Ausgangswert.

Bei dem unter verblindeten Bedingungen durchgeführten therapeutischen oder prophylaktischen Einsatz von Insol® Dermatophyton konnte mit dem hier gewählten

Therapieschema kein signifikant positiver Effekt auf die klinische Hautsymptomatik des Sommerkezems festgestellt werden. Es ließ sich jedoch der Trend erkennen, dass die mit ID geimpften Tiere im Sommer einen niedrigeren klinischen Score aufwiesen als die mit Placebo behandelten Tiere. Dieser war statistisch nicht signifikant, konnte aber durch eine Besitzerbefragung zum Vergleich des Behandlungsjahres mit dem Vorjahr bestätigt werden. Hierbei beurteilten die Besitzer der Verumpferde die klinische Ausprägung der Symptome ihrer Tiere als signifikant besser als im Vorjahr. Dieser Effekt wurde in der Placebogruppe nicht festgestellt. Allerdings gaben hier die Besitzer an, dass die Symptome im Behandlungsjahr signifikant einen Monat später als im Vorjahr begannen und ebenfalls statistisch signifikant einen Monat kürzer dauerten als im Vergleichsjahr. Die mit ID behandelten Jungekezemer (max. zwei Jahre Symptome) wiesen des Weiteren zu jedem Untersuchungszeitpunkt einen niedrigeren Score auf als die Tiere mit längerer Symptomatik (Altekezemer).

Bei der Untersuchung der Zytokine konnte ein immunmodulatorischer Effekt durch die Behandlung mit ID nachgewiesen werden. So stiegen die Konzentrationen von IL-10, TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  in der Verumgruppe deutlich und zum Teil auch statistisch signifikant nach der Impfung an, was eine Verschiebung der Immunantwort von Th2 (Allergie) zu Th1 (Toleranz) bedeutet. Dies wurde in der Placebogruppe nicht festgestellt.

Der Vergleich der beiden Allergietests - Funktioneller in-vitro Test (FIT) und Cellular Antigen Stimulation Test (CAST) - kam zu folgendem Ergebnis: Beide Tests lieferten auch in der insektenfreien Zeit repräsentative und annähernd vergleichbare Ergebnisse. Der FIT war jedoch mit der deutlich niedrigeren Zahl an falsch negativen Pferden der treffsicherere und dadurch genauere Test. Dies lag zum Großteil an den mitgetesteten kreuzreagierenden Insekten, die primär nicht am Sommerkezemkomplex beteiligt sind. Dies lässt darauf schließen, dass ein sehr breites Allergenspektrum für die Erkrankung Sommerkezem verantwortlich ist. Beide Tests waren jedoch in der Stärke der Ausprägung der Allergiebereitschaft im Winter deutlich höher. Ebenso waren die falsch-negativen Pferde im Winter weniger, was zu einem genaueren und zuverlässigeren Ergebnis im Winter führte.

Als letzter Punkt wurde der Verwurmungsgrad der Pferde mit dem Schweregrad des Sommerkezems im FIT gegenübergestellt. Hierbei zeigte sich, dass der Verwurmungsgrad nicht direkt proportional mit der Höhe des FIT war. Der Trend ging im Gegenteil dahin, dass stark verwurmte Pferde einen signifikant niedrigeren FIT aufwiesen als Pferde ohne aktuelle Verwurmung. Ein falsch positives Ergebnis des

Allergietests, ausgelöst durch eine starke Verwurmung des Tieres, konnte somit ausgeschlossen werden.

In weiterführenden Studien müsste untersucht werden, ob der in-vitro vorhandene immunmodulatorische Effekt durch eine Veränderung der ID Rezeptur verstärkt werden könnte, um somit auch in-vivo statistisch nachweisbar zu sein.

## 7 Summary

### Therapy of summer eczema using Insol® Dermatophyton – a field study

#### Magdalena Brunner

The main purpose of this experiment was to test the effect of Insol® Dermatophyton (ID) by employing a placebo controlled blind study, testing 51 horses suffering from summer eczema. The animals were vaccinated three times every two weeks in February of the year the experiment took place using ID (n=27) or placebo (n=24). Furthermore, the testing encompassed showing whether immunomodulatory effects could be detected when having used ID. For this purpose, each time the horses were tested – 5 times in total – blood samples of serum were taken in order to evaluate specific cytokines (IL-1, IL-4, IL-10, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ). As a third aim, both in-vitro allergy tests – “Funktioneller in-vitro Test” (FIT) and “Cellular Antigen Stimulation Test” (CAST) – were conducted and the results compared. Changes of the clinical results (alteration of skin, itching) were assessed by a score especially developed for this purpose, before, during and after the insect period of the respective testing year. Following the generally well-known predilection sites, 12 body regions were specified, each of which was analysed for five symptoms (hair breakage, alopecia, bloody/purulent skin alteration, dandruff) and rated using points between 0 (not apparent) and 5 (extremely apparent). By adding and evaluating these points, for each animal and each point in time the clinical intensity of the summer eczema could be quantified.

The symptom most apparent was the hair brittleness, followed by thickening of the skin. All symptoms, except for dandruff, were most intense in the summer and had their lowest value in the winter. Regarding the symptom of dandruff, it was vice versa. The region most afflicted was the neck, followed by the tail and the lower abdomen. The most obvious characteristic of the medical condition could be observed in summer, whereas in winter the symptoms were least apparent. It is possible though to gather conclusions from the score of the first examination in winter regarding the intensity of medical condition throughout the season. Horses with a high score in the winter were also afflicted worse in summer than horses with a generally lower score.

After having used ID in a therapeutical or prophylactic placebo controlled blind study, it could not be established that there was a significantly positive effect on the symptomatology of skin affected by summer eczema. However, a positive trend could be observed in that the ID vaccinated animals in summer had a lower score than the

ones which had been treated with a placebo. The score, nevertheless, was not statistically significant. This trend, however, could be confirmed by an owner-survey comparing the year of treatment with the year before. On this occasion the owners of the verum group evaluated the clinical appearance of the symptoms as significantly improved in the year of treatment compared with the year before. This effect could not be seen in the placebo group. Therefore in this group the owners declared that the average beginning of the symptoms was one month later (July) than the year before and lasted one month less (3 months), too. Both were statistically significant. Furthermore, the "young eczema" horses treated with ID (with symptoms of 2 years maximum) had a respectively lower score each time they were examined.

Having examined the cytokines, an immunomodulatory effect resulting from the therapy could be verified. For instance, the concentrations of IL-10, TNF $\alpha$ , and IFN $\gamma$  in the verum group rose considerably and what is also statistically significant, they rose after the vaccination too. This means an immunomodulatory shift from Th2 (allergy) to Th1 (tolerance). However, this effect could only be shown in-vitro.

Comparing both allergy tests FIT and CAST, the results were as follows: both tests come to representative and similar results, also regarding off-insect periods. Nevertheless, FIT is the more sensitive and therefore more accurate test, having an obvious lower number of false-negative horses. This is mainly due to the cross-reacting insects, which are not primarily involved in the summer eczema complex. This suggested that there is a very wide allergen-spectrum responsible for the summer eczema disease. In both tests, however, in winter the manifestation of summer eczema disposition in the winter was more extreme; there were also not as many false-negative horses in winter. All of this leads to a more accurate and reliable result in winter.

As a final point, the intensity of worm attack was contrasted with the severity of summer eczema symptoms in the FIT test. It could be shown that the worm attack was not directly proportional to the score of FIT. On the contrary, the tendency could be observed that verminous horses had a significantly lower FIT than horses without any actual worm attack. A false-positive result of the allergy test, caused by a strong worm attack, is therefore impossible.

Further studies will have to establish if the immunomodulatory effect, shown in-vitro, can be intensified by changing of the ID formula, hence allowing statistical evidence in-vitro.

## Literaturverzeichnis

Abdel-Salam M (1989): Nachweis des Allergieverdachts bei Pferden mit COB durch tracheobronchoskopische und zytologische Untersuchungen sowie durch in-vitro-Histaminfreisetzung aus Blut und Tracheobronchialsekret. Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, Dissertation

Aggarwal N, Holmes M (1999): Production and characterisation of two monoclonal antibodies recognising equine IgG Fc receptors. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 73: 296-299

Akdis M, Akdis C (2007): Mechanism of allergen-specific immunotherapie. *J Allergy Clin Immunol* 119: 780-791

Anderson G, Belton P, Kleider N (1991): *Culicoides obsoletus* (Diptera: Ceratopogonidae) as a Causal Agent of *Culicoides* Hypersensitivity (Sweet itch) in British Columbia. *J. Med. Entomol.* 28(5): 685-693

Anderson G, Belton P, Jahren E, Lange H, Kleider (1996): Immunotherapy trial for horses in British Columbia with *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) hypersensitivity. *J. Med. Entomol.* 33 (3): 458-466

Baker K, Quinn P (1978): A report on clinical aspects and histopathology of sweet itch. *Equine Vet. J.* 10: 243-248

Barbet J, Bevier D, Greiner E (1990): Specific immunotherapy in the treatment of *Culicoides* hypersensitive horses: a double-blind study. *Equine Vet. J.* 22 (4): 232-5

Banard B (1997): Some factors governing the entry of *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae) into stables. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 64 (3): 227-33

Baselgia S, Doherr M, Mellor P, Torsteindottir S, Jermann T, Zurbriggen A, Jungi T, Marti E (2006): Evaluation of an in vitro sulphidoleukotriene release test for diagnosis of insect bite hypersensitivity in horses. *Equine Vet. J.* 38 (1): 40-6

Bashir M, Andersen P, Fuss I, Shi H, Nagler-Anderson C (2002): An enteric helminth infection protects against an allergic response to dietary antigen. *J Immunol* 169: 3284-3292

Baumann U, Chouchakova N, Gewecke B, Kohl J, Carroll M, Schmidt R, Gessner J (2001): Distinct tissue site-specific requirements of mast cells and complement components C3/C5a receptor in IgG immune complex-induced injury of skin and lung. *J. Immunol.* 167: 1022-7

Bell R (1996): IgE, allergies and helminth parasites: a new perspective on an old conundrum. *Immunol. Cell Biol.* 74(4):337-45

Björnsdóttir S, Sigvaldadóttir J, Broström H, Langvad B, Sigurdsson A (2006): Summer eczema in exported Icelandic horses: influence of environmental and genetic factors. *Acta Vet. Scand.* 2006: 48:3

Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH

Braverman Y, Ungar-Waron H, Frith K, Adler H, Danieli Y, Baker K, Quinn P (1983): Epidemiological and immunological studies of sweet itch in horses in Israel. *Vet. Rec.* 112 (22): 521-4

Brünnlein G (2001): Funktioneller in-vitro-Test (FIT) für Typ I-Allergien beim Pferd: Nachweis allergischer Sensibilisierung bei Pferden mit chronisch obstruktiver Bronchitis (COB) sowie Einflüsse verschiedener Therapiemaßnahmen auf den Sensibilisierungsgrad von Patienten. Tierärztliche Hochschule Hannover, Dissertation

Chang T (2000): The pharmacological basis of ant-IgE therapy. *Nat. Biotechnol.* 18: 157-162

Cheng Q, Lixin L, Krilis S (2001): Cells with features of mast cells and basophils. *ACI International* 13: 197-203

Cookson W, Moffat M (1997): Asthma: an epidemic in the absence of infection? *Science* 275(5296):41-2

Costa J, Weller P, Galli S (1997): The cells of the allergic response: mast cells, basophils, and eosinophils. *JAMA* 278: 273-287

Daeron M, Malbec O, Latour S, Arock M, Fridman W (1995): Regulation of high-affinity IgE receptor-mediated mast cell activation by murine low-affinity IgG receptors. *J. Clin. Invest.* 95, 577-585

- Datta S (1939): Microfilarial ptyriasis in equines. *British Veterinary Journal* 95: 213-222
- De Weck A, Stadler B, Urwyler A, Bühlmann W & R (1993): Cellular allergen stimulation test (CAST) - a new dimension in allergy diagnostics. *Allergy Clin. Immunol. News*: 9-14
- De Weck A, Sanz M (2004) Cellular allergen stimulation test (CAST) 2003, a review. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 14 (4): 253-273
- Dirscherl P (1991): Allergiediagnostik beim Pferd: Untersuchungen an basophilen Granulozyten und Lymphozyten gesunder und chronisch lungenkranker Pferde. Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, Dissertation
- Dorenkamp B (1997): Homöopathische Behandlungsmöglichkeiten des Sommerekzems bei Pferden. *Biol. Tiermed. Sonderdruck*: 14. Jahrgang Heft 2: 47-52
- Dronov A, Rohwer J (2007): Hinweise für eine immunmodulatorische Wirkung von Insol® Dermatophyton auf equine Leukozyten in vitro. Abstractheft XVII. Tagung über Pferdekrankheiten im Rahmen der Equitana 2007 (102-104) und *Vet-MedReport Sonderausgabe V4 I 2007* (3)
- Enbergs H, Verdoss S (2005): Induktion von Interferon- $\gamma$  in T-Lymphozyten nach Applikation von Engystol® ad us. vet. *Biol. Tiermed. Sonderdruck*: 22. Jahrgang Heft 1: 7-11
- Fadok V, Greiner E (1990): Equine insect hypersensitivity: skin test and biopsy results correlated with clinical data. *Equine Vet. J.* 22 (4): 236-40
- Faul F, Erdfelder E, Lang A, Buchner A (2007): G\*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior Research Methods*, 39, 175-191.
- Fenner A (2009): Hautpilzbekämpfung und mehr mit dem polyvalenten Impfstoff Insol® Dermatophyton – eine Literaturübersicht. *Pferde Spiegel* 2009 (4): 182-285
- Ferroglio E, Pregel P, Accossato A, Taricco I, Bollo E, Rossi L, Trisciuglio A (2006): Equine Culicoides hypersensitivity: evaluation of a skin test and of humoral response. *J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med.* 53 (1): 30-3
- Foster A, McKelvie J, Cunningham F (1997): Inhibitor of antigen-induced cutaneous responses of ponies with insect hypersensitivity by the histamine-1 receptor antagonist chlorpheniramine *Vet. Rec.* 143(7):189-193

Frey H, Loescher W (2001): Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 2. Auflage

Froese A (1984): Receptors for IgE on mast cells and basophils. *Prog. Allergy* ,34, 1522-1525

Furuichi K, Rivera J, Isersky C (1985): The receptor for immunoglobulin E on rat basophilic leukemia cells: effect of ligand binding on receptor expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (82): 12312-12318

Galli S (2000): Mastcells and basophils. *Curr. Opin Hematol.* 7: 32-39

Gauchat J, Henchoz S, Mazzei G, Aubry J, Brunner T, Blasey H, Life P, Talabot L, Flores Romo J, Thompson M (1993): Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils. *Nature* 365: 901-914

Gehlhar K, Schlaack M, Becker W, Bufe A (1999): Monitoring allergy immunotherapy of pollen-allergic patients: the ratio of allergen-specific IgG4 to IgG1 correlates with clinical outcome. *Clin. Exp. Allergy* 29 (4): 497-506

Geiben T (2003): Untersuchungen zum Sommereczem sowie zum Einfluss des Immunmodulators Baypamun N® auf die Typ I-Allergie der Pferde. Tierärztliche Hochschule Hannover, Dissertation

Gell P, Coombs R (1968): Classification of allergic reactions for clinical hypersensitivity disease. In: P.G.H. Gell and R.P.A. Coombs: *Clinical aspects of immunology* Blackwell Scientific Publications, Oxford: 575-579

Gerber H (1994): *Pferdekrankheiten Bd.1: Innere Medizin einschließlich Dermatologie.* Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart

Graham S, Trees A, Collins R (2001): Down-regulated lymphoproliferation coincides with parasite maturation and with the collapse of both gamma interferon and interleukin-4 response in a bovine model of onchocerciasis. *Infect Immun* 69: 4313-4319.

Grammel T, Müller E (1989): Einsatz von biologisch aktiven Peptiden bei Pferden mit Sommereczem. *Tierärztl. Umschau* 44: 317-321

Gremmes S (2002): Das Sommereczem: praxisorientiertes Management. Sonderdruck zum Thema „Sommereczem“, *Pferdespiegel* 1&2/2002

- Haak-Frendscho M, Ridgway J, Shields R, Robbins K, Gorman C, Jardieu P (1993): Human IgE receptor alpha-chain IgG chimera blocks passive cutaneous anaphylaxis reaction in vivo. *J. Immunol.* 151: 351-358
- Haas H, Falkone F, Holland M, Schramm G, Haisch K, Gibbs B, Bufe A, Schlaak M (1999): Early interleukin-4: its role in the switch towards a Th2 response and IgE-mediated allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 119: 86-94
- Halldorsdottir S, Larsen H, Mehl R (1989): Intradermal challenge of Icelandic horses with extracts of four species of the genus *Culicoides*. *Res. Vet. Sci.* 47 (3): 283-7
- Halldorsdottir S, Larsen H (1991): An epidemiological study of summer eczema in Icelandic horses in Norway. *Equine Vet. J.* 237: 87-93
- Hayglass K, Gangur V, Simons F (2000): Chemokines – An immunoregulatory role in allergy beyond chemotaxis. *ACI International* 12, 13-19
- Heck H (1991): *Neues Lexikon der Pferdekrankheiten, Loseblattsammlung* Interest-Verlag, Kissingen
- Hellberg W, Wilson A, Mellor P, Doherr M, Torsteinsdottir S, Zurbriggen A, Jungi T, Marti E (2006): Equine insect bite hypersensitivity: immunoblot analysis of IgE and IgG subclass responses to *Culicoides nubeculosus* salivary gland extract. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 113 (1-2): 99-112
- Hurst M, Lola S, Lindberg R (2006): Immunomodulation of the hepatic egg granuloma in *Schistosoma japonicum*-infected pigs. *Parasite Immunol* 28: 681-686.
- Janeway C, Travers P (2002): *Immunologie.* Oxford Verlag Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik M (2005): *Immunobiology.* 6th edition, Garland Science, New York & London
- Kaul S (1998): *Typ I-Allergie beim Pferd: Prinzipielle Entwicklung eines funktionellen in-vitro Nachweises* Tierärztliche Hochschule Hannover, Dissertation
- Keppel K, Campbell K, Zuckermann F, Greeley E, Schaeffer D, Husmann R (2008): Quantitation of canine regulatory T cell populations, serum interleukin-10 and allergen-specific IgE concentrations in healthy control dogs and canine atopic dermatitis patients receiving allergen-specific immunotherapy. *Vet Immunol Immunopathol* 123: 337-344

- Kobelt C (2001): Zum Sommer ekzem, eine Typ I-Allergie beim Islandpferd: Verlauf der in vivo-Sensibilisierung von basophilen Granulozyten, nachgewiesen mit einem funktionellen in vitro-Test (FIT). Tierärztliche Hochschule Hannover, Dissertation
- Kolm-Stark G, Wagner R (2002): Intradermal skin testing in Icelandic horses in Austria. *Equine Vet. J.* 34 (4): 405-10
- Kovar L, Kopecky J, Rihova B (2001): Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* tick polarizes the cytokine profile toward Th2 and suppresses proliferation of T lymphocytes in human PBMC culture. *J. Parasitol.* 87(6): 1342-1348
- Krause K, Metz M, Makris M, Zuberbier T, Maurer M (2012): The role of interleukin-1 in allergy-related disorders. *Curr. Opin Allergy Clin. Immunol* 2012 (12): 477–484
- Krebs H (1999): *Eigenbluttherapie; Methoden, Indikation, Praxis.* Verl. Urban und Fischer bei Elsevier, 4. Auflage
- Krieg A (1999): Mechanisms and applications of immune stimulatory CpG oligodeoxynucleotides. *Biochemica et Biophysica Acta* 1489, 107-116
- Kubo S, Matsuoka C, Taya F, Kitamura T, Takai H, Yonekawa, Karasuyama H (2001): Drastic up-regulation of FcεRI on mast cells is induced by IgE binding through stabilization and accumulation of FcεRI on the cell surface. *J. Immunol.* 167: 3427-34
- Kurotaki T, Narayama K, Oyamada T, Yoshikawa H, Yoshikawa T (1994): Immunopathological study on equine insect hypersensitivity ("kasen") in Japan. *J. Comp. Pathol.* 110 (2): 145-52
- Lange S (2004): Untersuchung zur Vererbung des Sommer ekzems beim Islandpferd. Tierärztliche Hochschule Hannover, Dissertation
- Langner K, Darpel K, Drolet B, Fischer A, Hampel S, Heselhaus J, Mellor P, Mertens P, Leibold W (2008): Comparison of cellular and humoral immunoassays for the assessment of summer eczema in horses. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 122 (1-2): 126-37
- Langner K, Jarvis D, Nimitz M, Heselhaus J, McHolland L, Leibold W, Drolet B (2009): Identification, expression and characterisation of a major salivary allergen (Cul s 1) of the biting midge *Culicoides sonorensis* relevant for summer eczema in horses. *Int. J. for Parasitol.* 39 (2): 243-50

Lantz C, Yamaguchi M, Oettgen H, Imkatona I, Miyajima I, Kinet J, Galli S (1997): IgE regulates mouse basophil Fc epsilon RI expression in vivo. *J. Immunol.* 158(6): 2517-2521

Lebis C, Bourdeau P, Marzin-Keller F (2002): Intradermal skin tests in equine dermatology: a study of 83 horses. *Equine Vet. J.* 34 (7): 666-71

Lecoq F (1842-1843): Affection psorique comiliquée d'un phénomène singulier, occasionné par l'emploi irrationnel du sulfure de potasse  
Memoires de la Société Vétérinaire des Departements du Calvados et de la Mance, 14ieme Année, No 10

Leibold W (2006): Vorlesung: Komponenten und Mechanismen des Immunsystems.  
Tierärztliche Hochschule Hannover

Löscher W, Ungemach F, Kroker R (2003): Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren. Parey Blackwell Verlag, Berlin/Wien, 6. Auflage

Mac Glashan D, Peters S, Warner J, Lichtenstein L (1986): Characteristics of human basophil sulfidopeptide leukotriene release: Releasability defined as the ability of basophils to respond to dimeric cross-links. *J. Immunol.* 136: 2231-2239

Magro A, Rudofsky U, Schrader W, Prendergast J (1987): Characterisation of IgE-mediated histamine release from equine basophils in vitro. *Equine Vet. J.* 19: 352-356

Marti E, Gerber H, Lazary S (1992): On the genetic basis of equine allergic diseases: II. Insect bite dermal hypersensitivity. *Equine Vet. J.* 24: 113-117

Marti E, Urwyler A, Neuenschwander M, Eicher R, Meier D, De Weck A, Gerber H, Lazary S, Dahinden C (1999): Sulfidoleukotriene generation from peripheral blood leukocytes of horses affected with insect bite dermal hypersensitivity. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 71 (3-4): 307-20

Mimura T, Amano S, Funatsu H, Yamagami S, Araie M, Kaji Y, Ishida Y, Usui T, Okamoto S (2004): Correlations between allergen-specific IgE serum levels in patients with allergic conjunctivitis in spring. *Ocul. Immunol. Inflamm.* 12 (1): 45-51

Morris D, Lindborg S (2003): Determination of 'irritant' threshold concentrations for intradermal testing with allergenic insect extracts in normal horses. *Vet. Dermatol.* 14 (1): 31-6

Morrow A, Quinn P, Baker K (1986): Allergic skin reactions in the horse: response to intradermal challenge with fractionated *Culicoides*. J. Vet. Med. B 33: 508-517

Mosmann T, Cherwinski H, Bond M, Giedlin M, Coffman R (1986): Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J. Immunol. 175: 5-14

Nakae S, Komiyama Y, Yokoyama H, et al. (2003): IL-1 is required for allergen-specific Th2 cell activation and the development of airway hypersensitivity response. Int. Immunol. 15: 483-490.

Olivry T, Marselle R, Iwasaki T, Müller R (2006): Validation of CADESI-03, a severity scale for clinical trials enrolling dogs with atopic dermatitis. ESVD and ACVD 18: 78-86

Ohashi Y, Tanaka A, Kakinoki Y, Ohno Y, Sakamoto H, Kato A, Masamoto T, Washio Y, Nakai Y (1997): Effect of immunotherapy on seasonal changes in serum-specific IgE and IgG4 in patients with pollen-allergic rhinitis Laryngoscope 107 (9): 1270-1275

Ott V, Tamir I, Niki M, Pandolfi P, Cambier J (2002): Downstream of Kinase, p62dok, is a mediator of Fcγ-RIIB inhibition of Fcε-RI signaling. J. Immunol. 168: 4430-4439

Purse B, Mellor P, Rogers D, Samuel A, Mertens P, Baylis M (2005): Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. Nat. Rev. Microbiol. 3 (2): 171-81

Quinn P, Baker K, Morrow A (1983): Sweet itch: Response of clinically normal and affected horses to intradermal challenge with extracts of biting insects. Equine Vet. J. 15: 266-272

Rieck R (1953): Studies on allergic dermatitis (Queensland itch) of the horse. I. Description, distribution, symptoms and pathology. Aust. Vet. J. 29: 177-84

Rieck R (1954): Studies on allergic dermatitis (Queensland itch) of the horse: the aetiology of the disease. Australian Journal of Agricultural Research 5: 109-129

Rolle M, Mayer A (1993): Medizinische Mikrobiologie, Infektions-und Seuchenlehre. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart

Rush B (2001): Clinical use of immunomodulatory agents. Equine vet. Educ. ,13, 45-53

Rüsbüldt A (1997): Sommerkezem, Erkennen, Vorbeugen, Behandeln. Cadmos Verlag

Rüsbüldt A (2001): Sommerekzem, Erkennen, Vorbeugen, Behandeln. Cadmos Verlag, 2. Auflage

Schmidt-Weber C, Blaser K (2004): Immunological mechanisms in specific immunotherapy. Springer Semin. Immunopathol. 25 (3-4): 377-90

Schmitz N, Kurrer M, Kopf M (2003): IL-1 receptor 1 is critical for Th2 cell type airway immune responses in a mild but not in a more severe asthma model. Eur. J. Immunol. 33: 991–1000

Schnuch A, Geier J, Uter W, Frosch P, Lehmacher W, Aberer W, Agathos M, Arnold R, Fuchs T, Laubstein B, Lischka G, Pietrzyk P, Rakoski J, Richter G, Rueff F (1997): National rates and regional differences in sensitization to allergens of the standard series. Contact Dermatitis 37 (1997), 200- 209

Sieveke J, Hamann A (1998): T helper 1 and T helper 2 cells respond differentially to chemokines. J. Immunol.160: 550-559

Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan M (2008): Hauterkrankungen beim Pferd- Pilzinfektionen. Der prakt. Tierarzt; 89 (Suppl.3): 13-16

Stadler B, Miescher S, Horn M, Pachlopnik J, Stadler M, Kricek F, Vogel M (2001): Allergic manifestations as the results of a conditional autoimmune response. Int. Arch. Allergy Immunol. 124: 411-413

Steidle B, Enbergs H (2003): Behandlung des Sommerekzems beim Pferd. Biol. Tiermed., 20. Jahrgang, Heft 1: 8-11

Steidle B (2009): Felduntersuchungen zur Ätiologie und Diagnose des Sommerekzems beim Islandpferd sowie zur Verlaufskontrolle einer Prophylaxe und Therapie mit homöopathischen Komplex-Präparaten in Verbindung mit Eigenblut anhand der funktionellen In-vitro-Tests HRT und CAST. Freie Universität Berlin, Dissertation

Strothmann A (1982): Beitrag zum Sommerekzem (Allergische Dermatitis) der Islandpferde. Literaturstudie und eigene Untersuchungen. Tierärztliche Hochschule Hannover, Disseration

Strothmann -Lüerssen A, Kietzmann M, Rostock A (1992): Das Sommerekzem beim Islandpferd: Epidermale Eicosanoidkonzentration, Proliferationsparameter und histologische Veränderungen in betroffenen Hautpartien. *Pferdeheilkunde* 8, 6: 385-390

Tizard I (1993): Treatment of respiratory disease by means of immunomodulators. In: *Proceedings of the 12th Veterinary Respiratory Symposium Comparative Respiratory Society, Pennsylvania*

Tizard I (2004): *Veterinary Immunology: An Introduction*. Saunders, Philadelphia, 4. Auflage

Tokura Y, Röcken M, Clark R, Maurer M, Grabbe S, Haliasos E, Takigawa M, Sinha A (2001): What are the most promising strategies for the therapeutic immunomodulation of allergic diseases? *Exp. Dermatol.* 10(2): 128-137

Ungar-Waron H, Braverman Y, Gluckman A, Trainin Z (1990): Immunogenicity and allergenicity of *Culicoides imicola* (Diptera: Ceratopogonidae) extracts. *Zentralbl. Veterinärmed. B.* 37 (1): 64-72

Unkel M (1985): *Zur genetischen Fundierung des Sommerekzems beim Islandpferd*. Universität Bonn, Dissertation

Van Rooyen C, Anderson R (2004): Assessment of determinants of optimum performance of the CAST-2000 ELISA procedure. *J. Immunol. Methods.* 288 (1-2):1-7

Wagner B, Siebenkotten G, Leibold W, Radbruch A (2002): Expression of a 4-(hydroxy-3-nitro-phenyl): acetyl. (NP): specific equi-murine IgE antibody that mediates histamine release in vitro and a type I skin reaction in vivo. *Equine Vet. J.* 34: 657-665

Wagner B, Radbruch A, Rohwer J, Leibold W (2003): Monoclonal anti-equine IgE antibodies with specificity for different epitopes on the immunoglobulin heavy chain of native IgE. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 92 (1-2): 45-60

Watanabe N, Akikusa B, Park S, Ohno H, Fossati L, Vecchiotti G, Gessner J, Schmidt R, Verbeek J, RYFFEL B, IWAMOTO I, IZUI S & SAITO T (1999): Mast cells induce autoantibody-mediated vasculitis syndrome through tumor necrosis factor upon triggering Fcγ receptors. *Blood* 94: 125-139

Westritschnig K, Kraft D, Valenta R (2002): Rekombinante Allergene in der Diagnose der Typ I-Allergie *Laboratoriums Medizin* 26 (3-4): 120-29

Westritschnig K, Valenta R (2003): Can we genetically engineer safer and more effective immunotherapy reagents? *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 3 (6): 495-500

Wilson A, Harwood L, Bjondottir S, Marti E, Day M (2001): Detection of IgG and IgE serum antibodies to *Culicoides* salivary gland antigens in horses with insect dermal hypersensitivity (sweet itch). *Equine Vet.J.* 33(7): 707-713

Wilson A, Harwood L, Torsteinsdottir S, Marti E (2006): Production of monoclonal antibodies specific for native equine IgE and their application to monitor total serum IgE responses in Icelandic and non-Icelandic horses with insect bite dermal hypersensitivity. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 112 (3-4): 156-70

Wilson A, Heesom K, Mawby W, Mellor P, Russel C (2008): Identification of abundant proteins and potential allergens in *Culicoides nubeculosus* salivary glands. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 122 (1-2): 94-103

Wittmann E, Mellor P, Rogers D, Samuel A, Mertens P, Baylis M (2001): Using climate data to map the potential distribution of *Culicoides imicola* (Diptera: Ceratopogonidae) in Europe. *Rev. Sci. Tech.* 20 (3): 731-40

Wohlleben G, Erb K (2001): Atopic disorders: a vaccine around the corner? *Trends. Immunol.* 22: 618-621

[www.dwd.de](http://www.dwd.de) Stand: August 2014

Yanagihara Y, Kajiwara K, Basaki Y, Ikizawa K, Ebisawa C, Tachimoto H, Saito H (1998): Cultured basophils but not cultured mast cells induce human IgE synthesis in B cells after immunologic stimulation. *Clin. Exp. Immunol.* 111: 575-579

Zhu D, Kepley C, Zhang M, Zhang K, Saxon A (2002): A novel human immunoglobulin Fc gamma Fc epsilon bi-functional fusion protein inhibits Fc epsilon RI-mediated degranulation. *Nat. Med.:* 518-521

## 9 Anhang

### 9.1 Fragebogen zur Studie „Sommerkzem“

#### Fragebogen zur Studie „Sommerkzem“

Datum:

#### 1. Besitzer

- Name \_\_\_\_\_
- Wohnort mit Postleitzahl \_\_\_\_\_

#### 2. Pferd

- Name
- Rasse
- Alter
- Geschlecht
- Farbe
- Verwendung
  - Freizeit                       Zucht/Weide
  - Sport                      → Leistungsklasse:  E/A       L/M       S

#### 3. Allgemeines

- **Haltung**
  - Box                       Paddockbox                       Offenstall
- **Koppelgang**
  - stundenweise     tagsüber     nachts                       Tag und Nacht
- **Einstreu**
  - Stroh     Späne                       sonstiges \_\_\_\_\_
- **Fütterung**
  - Heu     Silage/Gärheu                       Gras                       Stroh
  - Hafer     Müsli                       Zusatzfutter                       sonstiges \_\_\_\_\_

- **Impfstatus**

Tetanus:

Influenza:

EHV1/4:

- **Entwurmungsstatus**

o Regelmäßige Entwurmung?

**NEIN**

**JA**

1 x  2 x  3 x  4 x pro Jahr

o letzte Entwurmung

am

mit

- **Dauermedikation**

**NEIN**

**JA**

welches Medikament \_\_\_\_\_

- **Decke**

Stall

Regen

Ekzemer

Fliegen

- **Bekannte Vorerkrankungen (z.B. Heuallergiker/COB...)**

**NEIN**

**JA**

Behandlung mit: \_\_\_\_\_

#### 4. Vorbericht

- **Seit wann befindet sich das Pferd in Ihrem Besitz?**

weniger als 2Jahre  länger als 2 Jahre  seit \_\_\_\_\_

- **Hatte das Pferd beim Kauf schon Symptome?**

**NEIN**

**JA**

Welche:  Juckreiz  leicht  mittel  stark

haarlose Stellen  leicht  mittel  stark

sonstiges: \_\_\_\_\_  leicht  mittel  stark

- **Wurde eine Kaufuntersuchung durchgeführt?**

**NEIN**  **JA**

War die Haut zu diesem Zeitpunkt ohne besonderen Befund?

**NEIN**  **JA**

- **Hat der Vorbesitzer beim Kauf von Hautproblemen berichtet?**

**NEIN**  **JA**

- **Wo wurde das Pferd gekauft?**

Land \_\_\_\_\_

Bundesland \_\_\_\_\_

Regierungsbezirk \_\_\_\_\_

- **In welcher Jahreszeit wurde das Pferd gekauft?**

Frühjahr  Sommer  Herbst  Winter

- **Seit wann hat das Pferd die Symptome/Erkrankung?**

weniger als 2 Jahre  länger als 2 Jahre

seit \_\_\_\_\_ (wenn bekannt)

- **Kam(en) die Erkrankung/Symptome**

plötzlich  langsam/schleichend

- **Gab es einen auslösenden Faktor wie z.B.**

Stallwechsel  weniger als 100km vom alten Stall

mehr als 100 km vom alten Stall

anderes Land/Bundesland

von \_\_\_\_\_ nach \_\_\_\_\_

Futterwechsel

Medikamente  wenn bekannt: welche? \_\_\_\_\_

- **Haben sich die Symptome im Laufe der Zeit**

gebessert  verschlechtert  gleichgeblieben

### 5. Ausprägung/Art der Erkrankung und Symptome

- **Wo war der Beginn der Haut -/Fellerkrankung?**

Mähne       Schweif       Unterbauch       sonstiges \_\_\_\_\_

- **Ausdehnung der Veränderungen auf:**

Gesicht       Ohren       Hals       Widerrist  
 Mähne       Schweif       Rumpf       Unterbauch        
 Beine       Kronsaum       Fessel       Leiste  
 Innenschenkel

- **Wie sehen die Symptome/die Erkrankung/ das Krankheitsbild aus?  
(Mehrfachnennungen möglich)**

Juckreiz       leicht  mittel  stark  
 haarlose Stellen       leicht  mittel  stark  
 Schuppen       leicht  mittel  stark  
 blutige Krusten       leicht  mittel  stark  
 Hautverdickung       leicht  mittel  stark  
 sonstiges \_\_\_\_\_  leicht  mittel  stark

- **Hat das Pferd Ihrer Meinung nach Schmerzen?**

NEIN

JA       leicht       mittel       stark

- **Gibt es einen Zeitpunkt wo die Symptome/Erkrankung besonders schlimm ist? (Jahreszeitlich)**

NEIN

JA       Frühjahr       Sommer       Herbst       Winter  
 Morgens       Mittags       Abends       Nachts

- **Wurden bei Ihrem Pferd Hauterkrankungen diagnostiziert?**

NEIN

JA       Milben       Pilz       Sommerekzem

o Wie?

Bluttests

FIT Test       CAST® Test       Ig E Bestimmung

Ergebnisse (wenn bekannt) \_\_\_\_\_

Hauttests

Intrakutantest („Allergietest“)       Biopsie

Hautgeschabsel

Ergebnisse (wenn bekannt) \_\_\_\_\_

- **Haben sie bereits Therapieversuche hinter sich?**

**NEIN**

**JA**

Glucocorticoide     Cremes    Decke    Repellentien

Eigenblut             Homöopathika     sonstiges: \_\_\_\_\_

Wann? \_\_\_\_\_

Wirkung? \_\_\_\_\_

- **Wie würden Sie den Schweregrad der Krankheit Ihres Pferdes einstufen?**

keine Symptome

leichte Symptome

mittlere Symptome

schwere Symptome

- **Haben Sie in Ihrer Gegend eine starke Insektenbelastung?**

**NEIN**

**JA**

- o **Wann?**

Frühjahr     leicht     mittel     stark

Gnitzen    Bremsen    Kriebelmücken    Stallfliegen

Sommer     leicht     mittel     stark

Gnitzen    Bremsen    Kriebelmücken    Stallfliegen

Herbst     leicht     mittel     stark

Gnitzen    Bremsen    Kriebelmücken    Stallfliegen

**Vielen Dank für Ihre Mithilfe!!**

## 9.2 Patientendaten

<u>Nr.</u>	<u>Rasse</u>	<u>Alter</u> <u>(Jahre)</u>	<u>Geschlecht</u>	<u>Farbe</u>	<u>Jungekzemer</u>
1	Norweger-Mix	9	s	Falbe	nein
2	RP	6	s	Falbe	nein
3	Pony	17	w	Rappe	nein
4	WB	3	w	Falbe	ja
5	Friese	6	w	Rappe	nein
6	Isländer	14	w	Fuchs	nein
7	Criollo	12	s	Palomino	nein
8	Welsh A	9	s	Brauner	nein
9	Isländer	20	w	Fuchs	nein
10	KB	2	h	Rappe	ja
11	Pony	5	w	Schimmel	ja
12	Haflinger	8	s	Fuchs	ja
13	Bayr. WB	6	w	Schwarzbrauner	nein
14	WB	8	w	Schimmel	nein
15	Criollo	10	w	Schwarzbrauner	nein
16	Criollo	6	w	Brauner	nein
17	RP	25	w	Brauner	nein
18	WB	5	s	Fuchs	nein
19	Welsh A	10	s	Brauner	nein
20	Tinker	9	w	Schecke	nein
21	Friese	2	s	Rappe	ja
22	Criollo	15	w	Falbe	nein
23	WB	12	w	Schecke	nein
24	Friese	11	w	Rappe	nein
25	Walk Appaloosa	3	h	Brauner	ja
26	Walk Appaloosa	3	h	Rappe	nein
27	KB	7	w	Tigerschecke	nein
28	Paso Fino	19	s	Schwarzbrauner	ja
29	Rottaler	9	s	Schwarzbrauner	nein

30	Isländer	31	w	Rappe	nein
31	KB-Mix	20	s	Brauner	nein
32	PRE	13	w	Schimmel	nein
33	PRE	13	w	Schimmel	nein
34	RP	8	w	Schimmel	nein
35	WB	4	s	Rappe	ja
36	Trakehner	2	s	Fuchs	ja
37	Friese	6	s	Rappe	nein
38	Traber-Mix	4	w	Brauner	ja
39	Criollo	10	w	Brauner	ja
40	KB	10	h	Brauner	ja
41	Friese	7	w	Rappe	nein
42	Criollo	9	w	Schwarzbrauner	nein
43	PRE	5	w	Schimmel	ja
44	KB	6	w	Fuchs	ja
45	Fjord	20	w	Falbe	ja
46	Fjord-KB-Mix	10	w	Falbe	ja
47	Arabo-Friese	6	w	Schimmel	nein
48	Shettland-Mix	12	s	Schecke	ja
50	WB	7	w	Brauner	nein
51	WB	6	s	Schwarzbrauner	nein
53	Haflinger	14	w	Fuchs	nein

WB Warmblut

KB Kaltblut

RP Reitpony

h Hengst

s Stute

w Wallach

## 9.3 Allgemeinuntersuchung

<u>Nr.</u>	<u>AV</u>	<u>EZ</u>	<u>HE</u>	<u>HF</u>	<u>AF</u>	<u>LBH</u>	<u>MSH</u>	<u>KFZ</u>	<u>IKT</u> (°C)	<u>Gewicht</u> (kg)
1	nervös	gut	ggr. verm.	36	12	br	br	< 2	37,8	339
2	r&a	gut	erhalten	40	20	br	br	< 2	37,5	339
3	r&a	sehr gut	erhalten	40	10	br	br	< 2	37,5	176
4	l&a	gut	erhalten	36	11	br	ggr. ger.	< 2	38,3	504
5	r&a	gut	erhalten	32	6	br	br	< 2	37,6	532
6	r&a	gut	erhalten	24	14	br	ggr. ger.	3	37,4	414
7	r&a	gut	erhalten	36	14	ggr.ger.	ggr. ger.	< 2	37,4	458
8	r&a	mindergut	erhalten	28	6	mgr. ger.	br	3	37,4	230
9	r&a	gut	erhalten	36	18	br	br	< 2	37,5	378
10	r&a	gut	erhalten	32	16	br	br	< 2	38,2	748
11	r&a	gut	erhalten	36	12	ggr.ger.	br	< 2	37,2	255
12	r&a	sehr gut	erhalten	36	26	br	br	< 2	37,4	498
13	r&a	gut	erhalten	68	16	br	br	< 2	37,5	567
14	r&a	gut	erhalten	32	12	ggr.ger.	br	< 2	37,1	420
15	r&a	gut	erhalten	24	8	br	br	< 2	37,5	432
16	r&a	gut	erhalten	36	12	mgr. ger.	br	< 2	37,9	524
17	r&a	gut	erhalten	44	10	br	br	2	37,5	384
18	r&a	gut	erhalten	32	8	br	br	< 2	37,8	574
19	r&a	gut	erhalten	28	18	br	br	< 2	37	210
20	r&a	sehr gut	erhalten	36	14	ggr.ger.	br	< 2	37,5	504
21	r&a	gut	erhalten	32	10	mgr. ger.	br	< 2	37,7	451
22	r&a	gut	erhalten	28	6	br	br	< 2	36,6	426
23	nervös	mindergut	erhalten	48	22	mgr. ger.	ggr. ger.	2	37,3	408
24	r&a	gut	erhalten	48	12	br	br	< 2	37,5	698

25	l&a	gut	erhalten	48	10	ggr.ger.	br	< 2	37,7	458
26	r&a	gut	erhalten	40	10	br	br	< 2	37,3	402
27	r&a	sehr gut	erhalten	44	16	br	br	< 2	37,7	889
28	r&a	gut	erhalten	32	8	br	br	2	37,8	396
29	r&a	gut	erhalten	36	12	br	br	< 2	37,7	589
30	r&a	gut	erhalten	28	20	br	br	< 2	37,1	420
31	r&a	gut	erhalten	32	10	br	br	< 2	37,4	574
32	r&a	sehr gut	erhalten	24	14	ggr.ger.	br	< 2	37,6	478
33	r&a	sehr gut	erhalten	32	10	ggr.ger.	br	< 2	37,8	589
34	r&a	sehr gut	erhalten	36	16	br	br	< 2	37,7	504
35	r&a	gut	erhalten	40	8	ggr.ger.	br	< 2	38	518
36	l&a	mittelgut	erhalten	44	10	ggr.ger.	ggr.ger.	< 2	38	402
37	r&a	sehr gut	erhalten	36	6	br	br	2	38	532
38	r&a	gut	erhalten	32	8	br	br	< 2	37,6	432
39	r&a	gut	erhalten	36	16	br	br	< 2	37	567
40	r&a	gut	erhalten	36	10	br	br	< 2	37,8	948
41	r&a	gut	erhalten	60	14	ggr.ger.	br	< 2	37,5	589
42	r&a	gut	erhalten	44	8	ggr.ger.	br	< 2	37,4	445
43	r&a	gut	erhalten	44	12	ggr.ger.	br	2	37,3	574
44	r&a	gut	erhalten	36	22	mgr.ger.	ggr.ger.	2	37,2	879
45	r&a	sehr gut	erhalten	36	18	br	br	< 2	37,4	504
46	r&a	gut	erhalten	44	24	br	br	2	37	432
47	r&a	sehr gut	erhalten	36	8	br	br	< 2	37,6	524
48	r&a	gut	erhalten	56	14	br	br	2	37,3	238
50	r&a	gut	erhalten	36	14	br	br	< 2	37,4	582
51	r&a	gut	erhalten	40	12	ggr.ger.	br	< 2	37,9	574
53	r&a	sehr gut	erhalten	36	12	br	br	< 2	37,8	524

AV Allgemeinverhalten

EZ Ernährungszustand

HE Hautelastizität

r&amp;a ruhig und aufmerksam

HF Herzfrequenz

AF Atemfrequenz

LBH Lidbindehaut

ger. gerötet

MSH Maulschleimhaut

KFZ Kapillarfüllzeit

IKT Innere Körpertemperatur

br blassrosa

## 9.4 Score

Nr.	Punkte	Note	Punkte	Note	Punkte	Note
	<u>EU</u>	<u>EU</u>	<u>ZU</u>	<u>ZU</u>	<u>AU</u>	<u>AU</u>
1	8	2	-	-	56	3
2	4	2	26	2	17	3
3	0	0	20	2	21	2
4	4	1	39	2	34	3
5	29	3	52	3	26	3
6	3	1	63	4	91	4
7	14	1	62	4	-	-
8	16	1	38	2	36	3
9	9	1	39	3	33	3
10	3	1	-	-	-	-
11	12	0	3	1	3	0
12	0	0	19	2	5	0
13	5	1	4	1	7	1
14	3	1	7	1	21	3
15	3	1	11	1	19	2
16	4	2	39	3	24	3
17	26	3	40	3	43	4
18	14	1	18	2	19	2
19	22	2	64	4	44	3
20	23	2	47	3	53	3
21	15	2	-	-	-	-
22	20	2	59	4	40	3
23	20	2	13	2	27	3
24	37	4	98	5	72	4
25	7	1	9	1	14	1
26	14	1	29	2	8	1
27	32	3	56	3	-	-
28	7	0	13	0	8	0
29	23	2	21	2	23	3
30	13	2	87	5	-	-
31	37	4	107	5	60	4
32	17	3	98	5	46	4

33	24	3	60	5	38	4
34	4	1	39	4	20	3
35	2	0	3	1	7	1
36	0	0	5	0	10	2
37	11	1	39	2	21	2
38	8	1	9	2	19	3
39	7	1	56	3	27	2
40	16	2	56	3	-	-
41	14	1	19	2	-	-
42	6	0	10	1	24	2
43	5	1	15	1	10	2
44	23	3	91	5	32	3
45	23	3	63	4	42	4
46	11	2	44	4	37	3
47	0	0	2	0	1	0
48	3	1	10	1	25	2
50	20	1	22	2	-	-
51	18	2	25	2	25	2
53	4	0	30	3	15	3

EU Erstuntersuchung

ZU Zwischenuntersuchung

AU Abschlussuntersuchung

### 9.5 Statistisch vergleichende Auswertung der Scores der verschiedenen Untersuchungszeitpunkte

#### Test bei gepaarten Stichproben Verum

	Gepaarte Differenzen					T	df	Sig. (2-seitig)
	MW	STAW	Standardfehler des Mittelwertes	95% Konfidenzintervall der Differenz				
				Untere	Obere			
EU-ZU	-23,1	21,8	4,4	-32,1	-14,1	-5,3	24	,000
EU-AU	-16,6	18,7	4,0	-24,9	-8,3	-4,2	21	,000
ZU-AU	5,5	15,6	3,3	-1,4	12,4	1,7	21	,113

#### Test bei gepaarten Stichproben Placebo

	Gepaarte Differenzen					T	df	Sig. (2-seitig)
	MW	STAW	Standardfehler des Mittelwertes	95% Konfidenzintervall der Differenz				
				Untere	Obere			
EU-ZU	-25,4	24,6	5,1	-36,1	-14,8	-5,0	22	,000
EU-AU	-15,3	13,1	2,9	-21,3	-9,3	-5,3	20	,000
ZU-AU	10,5	20,8	4,7	0,7	20,2	2,2	19	,037





- andere: \_\_\_\_\_

**2010**

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

**2011**

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

- 3. Vergleichen Sie bitte allgemein den Schweregrad der Erkrankung für 2010 und 2011.**

**2010**

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

**2011**

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

- 4. Haben Sie, außer der Insol Therapie, eine Behandlungsänderung von 2010 auf 2011 vorgenommen?**

- Nein**  
 **Ja**

welche \_\_\_\_\_

(0= keine Symptome, 10= hochgradige Symptome)

## 10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Typischer Schweif („Rattenschwanz“) eines an SE erkrankten Pferdes. ...	6
Abbildung 2: „Elephantenhaut“ mit starkem Haarbruch und Alopezie am Mähnenkamm.....	7
Abbildung 3: Verdickte und blutige Präputialgegend und Bauchnaht.....	8
Abbildung 4: Schematische Darstellung der 12 exprimierten Sommerekzemstellen. ...	37
Abbildung 5: ELISA-Farbreaktion. Nach Zugabe des Substrats kommt es durch den Enzym-gekoppelten Sekundärantikörper zu einer blauen Farbbildung (a). Diese Reaktion wird nach 20 Minuten durch Zugabe von Schwefelsäure gestoppt, wodurch es zu einem Farbumschlag nach gelb (b) kommt, welcher photometrisch bestimmt wird (c). ....	41
Abbildung 6: Räumliche Verteilung der Studienpferde. ....	45
Abbildung 7: Rassenverteilung der Studienpferde. ....	46
Abbildung 8: Pferd Nr. 19: Stark befallener Hals mit starkem Haarbruch, deutlicher Alopezie und Hautverdickung (Elefantenhaut). ....	50
Abbildung 9: Pferd Nr. 24: Hochgradige Schuppenbildung Hals letztes Drittel. ....	51
Abbildung 10: Graphische Darstellung der Score-Entwicklung der beiden Untersuchungsgruppen zu den drei Untersuchungszeitpunkten.....	53
Abbildung 11: Graphische Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung der Scores zwischen Verum und Placebo in der Gesamtgruppe zu den Untersuchungszeitpunkten (US Untersuchung). ....	56
Abbildung 12: Graphische Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung der Scores zwischen Verum und Placebo der „matched-pairs“ zu den Untersuchungszeitpunkten (US Untersuchung). ....	57
Abbildung 13: Pferd Nr.16 - deutlich geschädigter Schweif in der Regenerationsphase. ....	65
Abbildung 14: Pferd Nr.44 - deutliche Alopezie mit blutigen Krusten am Kopf.....	69
Abbildung 15: Pferd Nr.44 Widerrist/Schulter/Hals - deutliche Alopezie mit blutigen Krusten und Hautverdickung. ....	70
Abbildung 16: Pferd Nr. 5 - deutliche Hautverdickung am Hals mit starkem Haarbruch.....	71
Abbildung 17: Pferd Nr. 5 Ansicht von oben - starker Haarbruch der Mähne mit Schuppenbildung, Alopezie und blutigen Krusten. ....	71
Abbildung 18: Graphische Darstellung der Insektenhäufigkeiten bei FIT und CAST im Vergleich. ....	73
Abbildung 19: Mittelwert und Standardabweichung der IL-1 Konzentration. ....	76

---

Abbildung 20: Mittelwert und Standardabweichung der IL-4 Konzentration. ....	80
Abbildung 21: Mittelwert und Standardabweichung der IL-10 Konzentration. ....	83
Abbildung 22: Mittelwert und Standardabweichung der IFN $\gamma$ Konzentration. ....	86
Abbildung 23: Mittelwert und Standardabweichung der TNF $\alpha$ Konzentration. ....	90
Abbildung 24: Graphische Darstellung TNF $\alpha$ Verum (c Konzentration, n Anzahl). ....	94
Abbildung 25: Vergleich Entwicklung TNF $\alpha$ Verum vs. Placebo .....	95

## 11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chronologischer Studienablauf.....	34
Tabelle 2: Ausprägung des SE beurteilt durch die Besitzer im Rahmen des Auswahlfragebogens.....	47
Tabelle 3: Punkteverteilung der Symptome.....	49
Tabelle 4: Punkteverteilung der Regionen zu den drei Untersuchungs-zeitpunkten. ....	52
Tabelle 5: Vergleich der Untersuchungszeitpunkte zwischen den „matched-pairs“ . ....	54
Tabelle 6: Vergleich von Mittelwert und Standardabweichung der Scores in der Gesamtgruppe und den „matched-pairs“ zu den Untersuchungszeitpunkten.....	55
Tabelle 7: Anzahl reagierender Pferde pro Insekt beim FIT I.....	59
Tabelle 8: Anzahl der reagierenden Tiere auf die acht Insekten. ....	60
Tabelle 9: Anzahl reagierender Pferde pro Insekt beim FIT II.....	60
Tabelle 10: Vergleich der Reaktionslage der Pferde zu beiden Testzeitpunkten im FIT.....	63
Tabelle 11: Anzahl reagierender Pferde pro Insekt beim CAST I.....	66
Tabelle 12: Anzahl reagierender Pferde pro Insekt beim CAST II.....	67
Tabelle 13: Vergleich der Reaktionen im CAST auf die getesteten Insekten.....	68
Tabelle 14: Reihung der Insektenhäufigkeit bei allen vier Tests. ....	72
Tabelle 15: Mittelwert und Standardabweichung der IL-1 Konzentration (pg/ml). ....	75
Tabelle 16: Verlauf der IL-1 Konzentration im Vergleich mit dem Ausgangswert.....	77
Tabelle 17: Vergleich der IL-1 Konzentration zwischen den aufeinander-folgenden Untersuchungszeitpunkten.....	78
Tabelle 18: Mittelwert und Standardabweichung der IL-4 Konzentration (pg/ml). ....	79
Tabelle 19: Mittelwert und Standardabweichung der IL-10 Konzentration (pg/ml). ....	82
Tabelle 20: Verlauf der IL-10 Konzentration im Vergleich mit dem Ausgangswert.....	84
Tabelle 21: Vergleich der IL-10 Konzentration der aufeinanderfolgenden Untersuchungszeitpunkte.....	84
Tabelle 22: Mittelwert und Standardabweichung der IFN $\gamma$ Konzentration (pg/ml).....	85
Tabelle 23: Verlauf der IFN $\gamma$ Konzentration im Vergleich mit dem Ausgangswert. ....	87
Tabelle 24: Vergleich der IFN $\gamma$ Konzentration zwischen den aufeinander-folgenden Untersuchungszeitpunkten.....	88
Tabelle 25: Beispielhafte Darstellung der IFN $\gamma$ Konzentrationen (pg/ml) bei je zwei Verum- und Placebopferden zu den fünf Untersuchungszeitpunkten.....	88
Tabelle 26: Mittelwert und Standardabweichung der TNF $\alpha$ Konzentration (pg/ml). ....	89
Tabelle 27: Verlauf der TNF $\alpha$ Konzentration im Vergleich mit dem Ausgangswert.....	91

Tabelle 28: Vergleich der TNF $\alpha$ Konzentration zwischen den aufeinander-folgenden Untersuchungszeitpunkten.....	91
Tabelle 29: Tabellarische Darstellung der Entwicklung der TNF $\alpha$ Konzentration im Vergleich der verschiedenen Untersuchungszeitpunkte. ....	93
Tabelle 30: Vergleich des Verwurmungsgrads der Erst-US mit Score und FIT.....	99
Tabelle 31: Vergleich des Verwurmungsgrads der Abschluss-US mit Score und FIT. ....	100

## 12 Danksagung

An erster Stelle möchte ich meiner engagierten Doktormutter Frau Prof. Dr. Heidrun Gehlen für die Ermöglichung dieser, mir sehr ans Herz gewachsene Arbeit, danken. Ohne ihre zuverlässige sachlich objektive und wohltuend kritische Betreuung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Auch die Bereitstellung aller benötigten Mittel habe ich ihr zu verdanken.

Ebenfalls ein großes „Dankeschön“ an die Firma Boehringer Ingelheim, speziell an Herrn Dr. A. Fenner, für die großzügige Bereitstellung der Impfstoffe und finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Ein riesiges „Vergelt´s Gott“ an meine Studienpferde für ihre großartige Kooperation, ebenso wie an Ihre zweibeinigen Besitzer.

Danke der Firma Laboklin, der TiHo Hannover und dem Institut für Parasitologie der LMU München für die Auswertung der Proben.

Vielen Dank auch an Johnny Klier für die Einweisung in die ELISA Auswertung, sowie telefonische Notauskünfte.

Ebenfalls ein großes Dankeschön an Herrn Dr. Reese ohne ihn wäre die komplexe statistische Auswertung schwer machbar gewesen.

Danke an Ulrike Schillinger sowie an das veterinärmedizinische Team des Klinikum Rechts der Isar für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und Geräte für die ELISA Auswertungen. Ebenfalls vielen Dank an Kathy Barske und Jeanette Steuer durch sie waren die langen Auswerttage viel effektiver und auch lustiger.

Danke an die Firma Esterer (AÖ) für die bereitwillige und unkomplizierte Annahme meiner Proben.

Vielen Dank an Frau Dr. Otzdorff für die liebevolle Betreuung sowie die Bereitstellung von Stickstoff. Hier gilt mein Dank auch an die Firma Electrovac, Salzweg.

Vielen Dank an meine Schwester Anna und an Monika Staudhammer für das stete Bereitstellen einer Übernachtungsmöglichkeit inklusive Vollverpflegung.

Danke auch an Cörry und Mary für die anglistische Unterstützung, sowie Simon und Stephi für den IT-support.

Last but not least möchte ich meiner Familie insbesondere meinen Eltern für die unermüdliche Unterstützung dieses Projekts in jeglicher Hinsicht danken. Ihr seid die Besten!!

## 13 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Passau, den 17.02.2016

Magdalena Brunner

---

Ort, Datum

---

Unterschrift