

Immunologische Reaktionen junger Haflinger auf eine kontrollierte Belastung (oral/ per inhalationem) mit Schimmelpilzen und Milben

Claudia Rade, H. J. Schuberth, W. Leibold und J. Kamphues

Institut für Tierernährung, Tierärztliche Hochschule Hannover

Zusammenfassung

Sechs Haflingerpferde im Alter zwischen 11 und 16 Monaten wurden wiederholt einem Antigengemisch aus Schimmelpilzen und Vorratsmilben (*Aspergillus flavus*, *Penicillium viridicatum* und *Acarus siro*) ausgesetzt, wobei die Belastung zuerst oral, danach inhalativ und abschließend mittels subkutaner Injektion erfolgte. Vor, während und nach den Belastungsphasen erfolgte in regelmäßigen Abständen die Entnahme von Serumproben, die in einem eigens für diese Versuchsreihe etablierten ELISA-Testsystem auf antigenspezifische Antikörper untersucht wurden. Keines der Tiere entwickelte unter der Belastung klinische Anzeichen einer Allergie. Während nach subkutaner Applikation bei allen Tieren ein deutlicher Anstieg an schimmelpilz- und milbenspezifischen Serumantikörpern im ELISA zu messen war, zeigte keines der Pferde einen Titeranstieg nach oraler Belastung. Nach inhalativer Provokation deutete sich lediglich bei einem der sechs Versuchspferde, das während der Belastung auch klinisch auffällig war, ein geringgradiger Titeranstieg an milbenspezifischen Antikörpern an.

Schlüsselwörter: Pferde, antigenspezifische Antikörper, ELISA, Schimmelpilze, Milben

Immunological reactions of young Haflinger horses due to controlled oral and inhalative challenge with fungi and mites

Six Haflinger horses (age ranged between 11 and 16 months) were repeatedly exposed to a mixture of moulds and forage mites (*Aspergillus flavus*, *Penicillium viridicatum* and *Acarus siro*) first by ingestion, followed by inhalation and finally via subcutaneous injection. Before, during and after these challenge periods serum samples were harvested in defined intervals and analyzed for antigen-specific antibodies in an ELISA-system especially developed for this study. None of the animals developed clinical signs of allergy. While the sera taken after subcutaneous injection gave strong positive reactions in the ELISA, none of the horses showed an increase in antibody-concentration after the oral challenge. Only one of the six horses indicated a slight increase in mite-specific-antibody-titer upon inhalation challenge.

keywords: horses, antigen-specific antibodies, ELISA, mites, fungi

Einleitung

Bei der Suche nach Ursachen für chronische Atemwegserkrankungen beim Pferd wird der hygienischen Qualität von Futtermitteln zunehmend Beachtung geschenkt. Wie in Feldstudien von *Küstermann* (1989) und *Zmija* (1991) sowie bei der Untersuchung von Einsendungen an das Institut für Tierernährung durch *Coenen* und *Kienzle* (1992) festgestellt werden konnte, weisen die in der Praxis verwendeten Futtermittel häufig erhebliche hygienische Mängel, d.h. einen stärkeren Schimmelpilz- oder Milbenbefall auf. *Schatzmann* et al. (1973) gehen davon aus, daß bei nahezu allen im Stall gehaltenen Pferden eine „latente Allergie“ gegen bestimmte Umweltantigene (wie z.B. Schimmelpilze) vorliegt, da sie diesen häufig ausgesetzt sind. Die Autoren erklären so die positiven Reaktionen klinisch unauffälliger Tiere im Intrakutantest. Für den direkten Kontakt mit den potentiell gesundheitsschädlichen Agentien kommen dabei drei Lokalisationen in Frage:

- der Magen-Darm-Trakt (nach oraler Aufnahme mit dem Futter)
- der Respirationstrakt (nach Inhalation)
- die Körperoberfläche (Haut, Konjunktiven)

Krankheitserscheinungen nach oraler Aufnahme von Schimmelpilzen und Milben äußern sich meist als Kolik, Enteritis, eventuell auch in Form einer Obstipation. So beschreiben *Kamphues* und *Böhm* (1990) das gehäufte Auftreten von „Krampfkoliken“ bei tragenden Stuten nach Verfütterung eines Hafers mit massivem Schimmelpilz- und Milbenbesatz. Nach *Ahlswede* (1995) sind auch einzelne Fälle von Magenrupturen und Hufrehe auf die Aufnahme stark verschimmelter Futtermittel zurückzuführen. Schwieriger ist die Bedeutung weniger stark belasteter Futtermittel einzuschätzen, da solche Futtermittel bei der Sinnenprüfung oft nicht negativ auffallen. Der Kausalzusammenhang zwischen dem im Bestand aufgetretenen gesundheitlichen Problem und dem

Schimmelpilz- bzw. Schädlingsbesatz des Futtermittels wird daher leicht übersehen.

Die Inhalation von milben- und schimmelpilzhaltigem Staub kann bei Pferden zu asthmaähnlichen allergischen Krankheitserscheinungen führen, die bei der Pathogenese der COPD eine wichtige Rolle spielen sollen. Den Pilzsporen kommt dabei eine maßgebliche potentiell allergene Bedeutung zu, nicht zuletzt weil sie aufgrund ihrer geringen Größe beim Einatmen bis in die tiefsten Lungenbezirke gelangen können (Raymond et al. 1994).

Vor diesem Hintergrund sollte mit dem hier vorgestellten Versuchsansatz geklärt werden, ob die wiederholte orale oder inhalative Belastung mit Schimmelpilzen und Milben bei jungen Pferden zu einer Immunantwort im Sinne einer serologisch nachweisbaren Antikörperantwort führt und ob Effekte zu beobachten sind, die eventuell auf eine Allergisierung bzw. Toleranzinduktion hinweisen.

Material und Methode

Versuchstiere

Die Versuche wurden mit 6 Haflingern (3 Stuten, 2 Wallache, 1 Hengst; Alter 11–16 Monate) durchgeführt. Da sie über einen Händler bezogen wurden, war über die vorherigen Haltungs- und Fütterungsbedingungen wenig bekannt. Die Tiere stammten alle aus dem norddeutschen Raum und wurden während der Wintermonate ausschließlich im Stall gehalten. Zu Versuchsbeginn waren die Tiere klinisch unauffällig. Sie wurden während des gesamten Versuchszeitraumes einstreulos gehalten und erhielten nur gewässertes Heu und ein pelletiertes Kraftfutter in eingeweicherter Form. Als Kontrolltiere, bei denen nur eine s.c.-Injektion der Antigenpräparationen vorgenommen wurde, dienten drei in Offenstallhaltung gehaltene Ponies (2 Stuten, 1 Wallach) im Alter von 7, 19 und 23 Jahren.

Schimmelpilze und Milben

Sowohl Milben als auch Schimmelpilze wurden aus Einsendungen (Proben von Futtermitteln schlechter hygienischer Qualität) an das hiesige Institut isoliert, bezüglich der Gattungszugehörigkeit bestimmt und in entsprechenden Kulturmedien vermehrt (Schimmelpilze auf Kimmig-Agar mit Antibiotikazusatz, Milben in gemahlenem Pferdekraftfutter). Die weitere Differenzierung der Schimmelpilze ergab, daß es sich um *Penicillium viridicatum* und *Aspergillus flavus* handelte.¹⁾

orale Belastung

Die Versuchspferde erhielten zuerst fünf Wochen lang einmal wöchentlich eine mit Milben und Schimmelpilzen

angereicherte Kraftfütteration. Die Schimmelpilze wurden dem Futter in Form einer Kulturabschwemmung zugesetzt. Dazu wurden dicht mit dem jeweiligen Schimmelpilz bewachsene Agarplatten mit je 5 ml steriler NaCl-Lösung (0,9%) abgeschwemmt, die Abschwemmflüssigkeit dem Versuchsfutter beim Einweichen zugesetzt und eine Probe des Versuchsfutters am selben Tag quantitativ auf Schimmelpilze untersucht. Hierbei wurden Keimgehalte von über 10^6 koloniebildende Einheiten (KBE)/g bezogen auf die Tagesration an Kraftfutter erreicht, was nach Meyer (1992) einem stark überhöhten Schimmelpilzgehalt im Kraftfutter entspricht. Die Milben wurden mit ihrem Kulturmedium gemahlen (zuvor Ermittlung des Milbengehaltes pro 100 mg Milbenkultur durch Auszählen unter der Stereolupe; 40fache Vergrößerung) und dem Versuchsfutter in einer solchen Menge zugesetzt, daß auf die Tageskraftfütteration bezogen ein Milbenbesatz von 60.000 Milben pro kg und damit ein hochgradiger Befall (Wilkin und Thind 1983) simuliert wurde.

inhalative Belastung

Anschließend wurden die Pferde für fünf Wochen einmal wöchentlich über eine Atemmaske 20 min lang mit einem milben- und schimmelpilzhaltigen „Staubgemisch“ belastet. Hierfür wurde zum einen gemahlenes, mit einer Pilzabschwemmung eingeweichtes, nach Keimzahlbestimmung gefriergetrocknetes und in der RETSCH-Mühle (Siebmaschenweite 0,2 mm) gemahlenes Pferdekraftfutter verwendet. Für 1g getrocknetes Substrat ergab sich ein mykologischer Keimgehalt von $1,66 \times 10^9$ KBE. Zum anderen wurde das milbenhaltige Substrat (10.000 Milben /g; s.o.) in gleicher Weise gemahlen und die beiden Fraktionen im Verhältnis 1:1 gemischt. Mittels einer Impaktormessung (8stufiger Berner Kaskadenimpaktor; Berner 1978) wurde die lungengängige Fraktion des Substrates ermittelt (Partikelgröße < $5 \mu\text{m}$). Sie betrug im Mittel 41%. Während der Belastung atmeten die Tiere Luft aus einer Plexiglas-Mischbox, in die der milben- und schimmelpilzhaltige Staub mittels Druckluft (Kompressor) eingebracht und so der von den Pferden eingeatmeten Luft beigemischt wurde. Für eine gleichmäßige Zufuhr des Staubes sorgte ein Dosierer mit Rührwerk²⁾. Zur Messung der Staubkonzentration in der von den Pferden inhalierten Luft wurde zwischen Mischbox und Atemmaske ein Photometer mit Flachsreiber geschaltet, das die aktuelle Staubkonzentration als Spannungssignale aufzeichnete. Unter Versuchsbedingungen wurden die von Zeitler (1986) in der Luft von Pferdeställen gemessenen maximalen Staubkonzentrationen von $1,2 \text{ mg/m}^3$ Luft um ein Mehrfaches überschritten (die Staubkonzentration je m^3 lag bis zu 16 mal höher).

²⁾ Institut für Toxikologie und Aerosolforschung der Fraunhofer Gesellschaft zur Förderung der angewandten Forschung e.V., Hannover, Herr Dr. Koch, Herr Windt

¹⁾ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig

s.c.-Injektion der Antigene

Ultraschall-Lysate der Milben, Aspergillen und Penicillien wurden den Kontroll- und Versuchspferden dreimal im Abstand von 10 bzw. 14 Tagen s.c. injiziert. Die Dosierung der Schimmelpilze orientierte sich an den Gehalten kommerzieller Impfstoffe in KBE. Für die Milben lagen keine Vergleichswerte vor, hier wurde je Impfdosis etwa die gleiche Menge Milbensubstrat verabreicht wie an gefriergetrocknetem Mycel in einer Impfdosis der Pilzpräparation enthalten war. Die beiden Boosterinjektionen erfolgten jeweils mit nur einem Drittel der Initialdosis.

Blutprobennahme

Nach Entnahme einer Kontrollprobe vor Versuchsbeginn (Ausgangswert) erfolgte die Gewinnung von Serumproben während des Fütterungs- und Inhalationsversuches wöchentlich, ab der 2. s.c.-Injektion in dreitägigem Abstand. Die Blutentnahme erfolgte mittels Vacutainersystem mit Röhrchen zur Serumgewinnung (ohne Zusatz) aus der Vena jugularis. Die Seren wurden bis zur Untersuchung im ELISA aliquotiert bei -20°C eingefroren.

klinische Überwachung

Während der Belastungsversuche wurden bei den Tieren in regelmäßigen Abständen Atem- und Pulsfrequenz sowie Körpertemperatur ermittelt. Im Inhalationsversuch wurden zusätzlich nach jeder Inhalation die arteriellen Blutgaswerte gemessen.

ELISA

Zur Untersuchung der Seren auf antigenspezifische Antikörper wurde ein ELISA entwickelt: Mikrotiterplatten

(„Maxisorp“; Fa. Nunc) wurden mit dem Überstand der zur s.c.-Immunsierung der Pferde verwendeten Ultraschall-Lysate beschichtet (100 µl/Kavität). Nach einer Inkubationszeit von 18 h bei 4°C wurden die Platten mit 0,5% Gelatine für 30 min bei Raumtemperatur geblockt, dann für eine Stunde mit den Pferdeseren (Verdünnungsstufen 1:500–1:16000) inkubiert, anschließend mit dem Detektionsantikörper (biotinylierte anti-Pferde-IgG (H+L)-Antikörper aus der Ziege; Fa. Dianova) beschickt, nach weiteren 45 min mit Streptavidinperoxidase für 30 min und anschließend mit dem Substrat Orthophenyldiamin für 20 min inkubiert. Zur Auswertung wurde die Reaktion mit 1N H₂SO₄ gestoppt und die Extinktion in den einzelnen Kavitäten photometrisch bei Wellenlängen von 490 und 630 nm gemessen. Mit Ausnahme der Beschichtung mit dem Antigen fanden alle Inkubationsvorgänge bei Raumtemperatur auf dem Plattenschüttler statt. Zwischen den einzelnen Arbeitsgängen wurden die Platten jeweils fünfmal maschinell mit Verdünnungspuffer (pH 7,2; Tweenzusatz) gewaschen.

Auswertung

Die Messung der Proben erfolgte in Duplikaten. Aus den Mittelwerten der Extinktionen wurden nach Abzug der technisch bedingten Hintergrundreaktion mithilfe der Referenz-Standard-Methode ELISA-Units berechnet. Die Berechnung erfolgte für jedes Pferd getrennt. Als Standardserum diente dabei jeweils das vor Versuchsbeginn gewonnene Serum (=10 Units). Das Verfahren zur Berechnung der ELISA-Units ist bei Petermann (1994) detailliert beschrieben. Die statistische Absicherung der Ergebnisse erfolgte mit dem T-Test für gepaarte Stichproben.

Tab. 1: Titerhöhe (ELISA-Units) der Versuchspferde nach oraler, inhalativer und s.c. Applikation der Antigenpräparationen (Ausgangswert vor Versuchsbeginn =10 Units)

Titer of antigen-specific antibodies (expressed in ELISA-Units) in sera of horses after oral, inhalative and s.c. antigen challenge (basic value before challenge = 10 Units)

Applikation	MILBEN			ASPERGILLUS			PENICILLIUM		
	oral	inhal.	s.c.	oral	inhal.	s.c.	oral	inhal.	s.c.
Pferd 1	12,2	10,9	142,3	10,8	10,3	52,6	10,7	10,2	31,7
Pferd 2	13,0	29,2	109,8	13,2	15,6	31,7	14,0	18,6	30,6
Pferd 3	8,3	10,4	76,3	7,1	8,7	55,3	10,0	12,4	40,8
Pferd 4	6,9	6,6	113,7	3,9	3,3	45,7	4,1	5,0	42,6
Pferd 5	7,9	9,5	38,0	9,7	9,2	23,9	6,8	5,7	6,6*
Pferd 6	3,0	3,7	36,6	9,5	9,7	30,7	7,1	10,7	23,5
Mittelwert	8,55	11,72	86,12	9,03	9,47	39,98	8,78	10,43	29,30
Stdabw.	3,6643	8,9825	43,225	3,2010	3,9256	12,961	3,4948	4,9520	13,157

* Während nach der 3. s.c.-Injektion der Antigenpräparation bei diesem Tier kein erhöhter Antikörpertiter gegen Penicillium mehr zu messen war, zeigte dieses Tier jedoch 7 d nach der 1. s.c.-Injektion einen Antikörpertiter in Höhe von 150 % des Ausgangswertes vor Versuchsbeginn.

Ergebnisse

Die Untersuchungen im ELISA ergaben, daß bereits mit den vor Versuchsbeginn entnommenen Seren Extinktionen gemessen werden konnten, die deutlich oberhalb der technisch bedingten Hintergrundreaktion lagen. Die Extinktionen der während des Fütterungs- und Inhalationsversuches gewonnenen Seren waren nur unwesentlich höher als die der vor Versuchsbeginn entnommenen Seren; z.T. lagen sie sogar deutlich unter den Ausgangswerten. Bei keinem der Versuchspferde löste die orale Belastung einen nennenswerten Titeranstieg milben- oder schimmelpilzspezifischer Antikörper im Serum aus. Nur bei einem Pferd war nach Abschluß des Inhalationsversuches ein geringgradiger Titeranstieg im Test gegen Milben als Antigen nachzuweisen (29,2 Units nach Inhalation gegenüber 13 nach oraler Belastung bei einem Ausgangswert von 10 Units vor Exposition). Dieses Tier war während des Inhalationsversuches auch klinisch auffällig (im Mittel die höchste Pulsfrequenz aller Versuchspferde, Körpertemperatur nach der 2. Inhalationsbelastung über 39°C, Rasseln und Knistern bei der Lungenauskultation, während der Belastung In- und Expiration verlängert, z. T. doppelschlägige Atmung).

Nach der Inhalation konnte nur bei dem Versuchspferd 2 ein geringgradiger Titeranstieg gemessen werden, der aber im Vergleich zu den durch s.c.-Injektion bei allen Versuchspferden erreichten Titeranstiegen (im Milbentest z.T. über 100 Units) wesentlich geringer ausfiel. Wie mittels der s.c.-Injektion gezeigt werden konnte, waren mit der Milbenpräparation stärkere Titeranstiege zu provozieren als mit den Pilzpräparationen.

Bei den Kontrolltieren war der Titeranstieg nach s.c.-Immunisierung nicht so deutlich wie bei den Versuchspferden (bei den Kontrolltieren Titeranstiege maximal um den Faktor 2 bei Schimmelpilzen und 4,5 bei Milben im Vergleich zu Faktor 5,5 bzw. 10 bei den Versuchspferden), was bei den beiden über 10 Jahre alten Tieren eventuell auf den erheblich höheren Antikörpertiter im Serum vor Immunisierung zurückzuführen war.

Diskussion

Sowohl aus Fallbeschreibungen aus der Praxis als auch aus umfangreichen Untersuchungen zum pathogenetischen Hintergrund chronischer Atemwegserkrankungen beim Pferd ist bekannt, daß bei dieser Tierart klinisch manifeste allergische Reaktionen auf ubiquitär in ihrer Umgebung vorhandene Antigene (z.B. auf Milben und Schimmelpilzen) vorkommen (Ahlsvede 1995, Zeitler 1986, Madelin et al 1991, Lawson et al. 1979, Raymond et al. 1994, Ripatti et al. 1990, Schatzmann et al. 1973). Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit war daher, ob durch eine kontrollierte orale oder inhalative Belastung mit bekannten Antigenen bei Pferden klinische Symptome oder serologische Reaktionen provoziert werden können, die auf eine eventuelle Allergisierung der Tiere hinweisen. Dies war nicht der Fall: Weder unter der ora-

len noch unter der inhalativen Belastung zeigten die Tiere eine nennenswerte Änderung ihres klinischen oder serologischen Status. Die Belastung mit Milben und Schimmelpilzen auf beiden Expositionswegen führt also auch in der hier vollzogenen, d.h. massiven Form nicht zwingend zur Auslösung einer Allergie.

Zwei Beobachtungen aus der Untersuchung der Serumproben im ELISA-Verfahren sollen hier besonders hervorgehoben werden:

1. Die Tiere wiesen bereits vor Versuchsbeginn Antikörper gegen die getesteten Antigene auf, was auf eine bereits vorher stattgefundene, immunologische Auseinandersetzung mit diesen Agentien hinweist, die unter der Voraussetzung konventioneller Haltungs- und Fütterungsbedingungen nur oral oder inhalativ erfolgt sein kann. Hier konnten die Ergebnisse von Madelin et al. (1991) bestätigt werden, die bei der Untersuchung eines Kollektivs von 54 lungengesunden, 2–3jährigen Vollblutpferden bei 50% der Tiere im Ouchterlony-Test präzipitierende Antikörper gegen verschiedene Schimmelpilzspecies fanden und daher diesen Nachweis als ungeeignet für die Allergiediagnostik erachteten. Im vorliegenden Fall wiesen sogar alle Tiere präformierte Antikörper auf, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, daß mit dem hier eingesetzten ELISA ein erheblich sensitiveres Testsystem zur Anwendung kam. Diese Antikörper könnten eine lokale protektive Funktion für das Individuum haben, womit sich das Ausbleiben eines Titeranstieges (Boostereffekt) nach oraler und inhalativer Belastung erklären ließe, wenn man einmal voraussetzt, daß die immunisierenden oder potentiell allergenisierenden Antigenepitope bei der für diese Versuche beschriebenen Methodik in ausreichender Menge und adäquater Form appliziert wurden.

Daß hierbei immunregulatorische Mechanismen wichtig sind, deutet sich bei Versuchspferd 2 an, das auf die inhalative Belastung mit einem geringen, aber dennoch deutlichen Anstieg seines Serumtiters gegen Milbenepitope reagierte. Warum diese Mechanismen alle hier untersuchten Pferde erfolgreich vor der Entwicklung einer klinisch manifesten Allergie schützten, obwohl dies aus der Praxis oft anders berichtet wird, bleibt zu klären.

2. Nach der s.c.-Injektion derselben Antigenpräparationen konnte jedoch bei allen Tieren ein deutlicher Anstieg des Antikörpertiters gegen Milben und Schimmelpilze festgestellt werden. Das bedeutet, die Tiere waren prinzipiell in der Lage, Antikörper gegen die fraglichen Antigene zu bilden. Eine Immuntoleranz gegenüber den applizierten Antigenen, hervorgerufen durch die „immunologischen Vorerfahrungen“ der Tiere vor Versuchsbeginn oder durch die orale bzw. die inhalative Exposition ist damit weitgehend auszuschließen. Lediglich gegenüber Penicilliumantigenen zeigte Versuchspferd 5 einen Antikörpertiterverlauf, der auf mögliche Toleranzmechanismen hinweist (erhöhter Antikörpertiter nach 1. s.c.-Antigeninjektion, aber Abfall des Antikörpertiters unter das Ausgangsniveau nach 3. s.c.-Gabe).

In weiterführenden Untersuchungen sollte deshalb den lokalen immunologischen Vorgängen erhöhte Aufmerksamkeit geschenkt werden. Dazu gehört die Untersuchung von Bronchialsputtflüssigkeit auf antigenspezifische Antikörper vor und während der Inhalationsversuche. Des Weiteren ist eine Differenzierung der im Serum bzw. in anderen, während des Versuchs gewonnenen Körperflüssigkeiten gefundenen Antikörper nach Isotypen einschließlich des IgE erforderlich, um eventuelle Unterschiede in der Beteiligung verschiedener Immunglobulinklassen in unterschiedlichen Stadien des Versuchs feststellen zu können. Eine solche Untersuchung war in der vorliegenden Studie noch nicht möglich, da entsprechende isotypspezifische Detektionssysteme noch nicht für Routine- oder umfangreiche Reihenuntersuchungen zur Verfügung standen.

Abschließend lassen sich die Ergebnisse der hier beschriebenen Untersuchungen wie folgt zusammenfassen: Weder durch die orale noch durch die inhalative, sondern nur durch die subkutane Applikation der Antigenpräparationen konnte bei den Versuchspferden eine Immunantwort im Sinne eines signifikanten Titeranstiegs der milben- bzw. schimmelpilzspezifischen Antikörper hervorgerufen werden.

Der Einsatz hygienisch mangelhafter Futtermittel führt demnach keineswegs zwangsläufig zu einer serologisch meßbaren Reaktion auf die enthaltenen Antigene (potentiellen Allergene) oder gar zu einer klinisch faßbaren Schädigung des Tieres. Nach Berichten aus der Praxis sind sowohl Milben als auch Schimmelpilze maßgeblich an der Entstehung eines allergischen Krankheitsgeschehens beteiligt. Derart kontaminierte Futtermittel sollten deshalb schon aus prophylaktischen Gründen nicht an Pferde verfüttert werden. Zur Induktion und Manifestation einer Allergie auf Milben oder Schimmelpilze müssen also weitere Faktoren hinzutreten, die hier experimentell nicht berücksichtigt wurden. Hierfür kommen z.B. genetische Disposition, Infektionen sowie Fehl- oder Mangelernährung in Frage (Thein 1995).

Literatur

Ahlswede, L. (1995): Pferdegesundheit: Hohe Ansprüche ans Pferdefutter stellen. *Reiter und Pferde in Westf.* 20 (10), 52–56
 Berner, A. (1978): Fünfstufiger Kaskadenimpaktor zur Messung der Massen-Größen-Verteilung von Aerosolen. *Chemie-Ing.-Tech.* 50 (5), 399

Coenen, M. und Kienzle, E. (1992): Beobachtungen zur hygienischen Beschaffenheit von Futtermitteln für Pferde in der tierärztlichen Ernährungsberatung. *Pferdeheilkd.*, Sonderdruck, Sept. 1992, Hippatrika Verlagsgesellschaft mbH, Calw, S.209–212
 Kamphues, J. und Böhm, K. H. (1990): Tierernährung für Tierärzte – aktuelle Fälle: „Krampfkoliken“ bei Pferden nach Fütterung eines verdorbenen Hafers. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschrift* 97, 367–368
 Küstermann, S. (1989): Eine Feldstudie zum Hygienestatus von Pferdefuttermitteln unter besonderer Berücksichtigung des Lipopolysaccharidgehaltes. Hannover, Tierärztliche Hochschule, vet. med. Diss.
 Lawson, G. H. K., Mc Pherson, E. A., Murphy, J. R., Nicholson, J. M., Wooding, P., Breeze, R. G. und Pirie, H. M. (1979): The presence of precipitating antibodies in the sera of horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Equine Vet. J.* 11 (3), 172–176
 Madelin, T. M., Clarke, A. F. und Mair, T. S. (1991): Prevalence of serum precipitating antibodies in horses to fungal and thermophilic actinomycete antigens: effects of environmental challenge. *Equine Vet. J.* 23 (4), 247–252
 Meyer, H. (1992): Verdorbene Futtermittel. in: *Pferdefütterung*, Meyer, H., Kapitel 2.4., S. 175, 2. Auflage 1992, Verlag Paul Parey Hamburg, Berlin
 Petermann, M. (1994): Charakterisierung der in-vivo-Wirkung monoklonaler Rattenantikörper bei Ratten mit experimenteller Rotlaufinfektion. Hannover, Tierärztliche Hochschule, vet. med. Diss.
 Raymond, S. L., Curtis, E. F. und Clarke, A. F. (1994): Comparative dust challenges faced by horses when fed alfalfa cubes or hay. *Equine Pract.*, 16 (10), 42–47
 Ripatti, T., Koskela, P., Kotimaa, M., Koskinen, E. und Mäenpää, P. H. (1990): Serum IgG antibody concentrations against environmental microbes in mares and foals during different seasons and effect of stabling practices. *Am. J. Vet. Res.* 51 (4), 550–555
 Schatzmann, U., Gerber, H., Straub, R., Lazary, S. und De Weck, A. L. (1973): Applied immunology in chronic pulmonary conditions. *Proc. 3rd int. Conf. Equine Infectious Diseases*, Paris 1972, 448–457, Verlag Karger, Basel 1973
 Thein, P. (1995): Pferdegesundheit: Erkrankungen der Atemwege. *Reiter und Pferde in Westf.* 20 (4), 52–54
 Wilkin, D. R. und Thind, B. B. (1983): Stored product mites detection and loss assessment in animal feed. *Proc. of the 3rd Int. Working Conf. on Stored-Product Ent.*, Manhattan, Kansas (USA), 1983, 608–620
 Zeitler, M. H. (1986): Staub-, Keim- und Schadgasgehalte in der Pferdestallluft unter besonderer Berücksichtigung der FLH- (Farmer's lung hay-) Antigene. *Tierärztl. Umsch.* 41 (11), 839–845
 Zmija, G. (1991): Fütterungspraxis bei Galopp- und Trabrennpferden. Hannover, Tierärztliche Hochschule, vet. med. Diss.

Claudia Rade

Institut für Tierernährung
 Tierärztliche Hochschule Hannover
 Bischofsholer Damm 15
 D-30173 Hannover