

Der Intrakutantest beim Pferd: Realistischere Betrachtung zur Anwendung - Wissenschaftliche Grundlagen und praktische Durchführung

Stefan Hampel¹, Jens Rohwer¹, Holger Leinemann², Cornelia Schrop¹, Robert E. Esch³ und Wolfgang Leibold¹

Immunologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover¹, Tierärztliche Praxis Dr. med. vet. Leinemann, Korntal-Münchingen² und Greer Labs., Lenoir, USA³

Zusammenfassung

Der Intrakutantest (IKT) zum Nachweis einer allergischen Pathogenese wird von vielen Pferdepraktikern als kritisch beurteilt, da er oft widersprüchliche Ergebnisse liefert. Dies führt häufig dazu, dass der Test insgesamt als wenig hilfreich angesehen wird. Ursachen für verwirrende Ergebnisse des IKT wurden in der vorliegenden Arbeit näher untersucht und die Ergebnisse in einer nachvollziehbaren Anweisung zur modifizierten Durchführung und Bewertung des IKT zusammengefasst. Bedingt durch die differierende Ausstattung der Haut mit unterschiedlich vorbereiteten Zellen und qualitativ wie quantitativ verschiedenen Mediatoren ist es physiologisch, dass lokale Hautreaktionen auf dieselbe Substanz sehr unterschiedlich ausfallen können. Daher ist die Bewertung der Hautreaktion an einer Injektionsstelle samt näherer Umgebung (Mikrofläche) in Abhängigkeit von der an einer anderen Mikrofläche nicht zulässig, da sie leicht zu Fehlbeurteilungen führt. Diese Art von Bewertung wird im „Referenzverfahren“ praktiziert, das eine Hautreaktion auf eine Testsubstanz (z. B. ein Antigen) abhängig macht von den Hautreaktionen auf eine positive (meist Histamin) und eine negative (nur Lösungsmittel) Referenzsubstanz. Physiologischer ist die Beurteilung der Hautreaktion nur an der Stelle, an der eine Testsubstanz injiziert wird. Über ihre Bewertung als positive oder negative Hautreaktion entscheidet allein ihre Entwicklung im Laufe der Zeit (30 Min bis 24 Stunden) und im Vergleich zu ihrer Ausgangsquadrat, die ohne Hautreaktion nur durch das intrakutan injizierte Flüssigkeitsvolumen bedingt ist. Eine Möglichkeit zur zeitabhängigen Bewertung einer lokalen Hautreaktion wird hier in Form des „Kinetikverfahrens“ vorgestellt. In dieser Form kann der Intrakutantest sehr wohl als ein wichtiges Hilfsmittel der ätiologischen in vivo Diagnostik Typ I allergischer Krankheiten dienen: Er erlaubt Aussagen über eine funktionelle Sensibilisierung der Hautmastzellen des Probanden. Deshalb ist seine „richtige“, d.h. möglichst physiologisch relevante Durchführung und Auswertung von entscheidender Bedeutung.

Schlüsselwörter: Intrakutantest (IKT), Bewertungsverfahren der Hautreaktion, Referenzverfahren, Kinetikverfahren, funktionelle Sensibilisierung der Mastzellen

Intradermal testing of horses: A more realistic view and its application

Intradermal tests (IDT) as diagnostic tool for hypersensitivity in horses are known to provide variable, sometimes contradictory results. Reasons for such obstacles and confusing results have been investigated in repeated intradermal testing of 24 Icelandic and 6 warm blooded horses. Due to physiological differences in the local outfit of the skin with different kinds of cells and of cells in variable priming and / or sensitization stages as well as with different kinds and quantities of mediators the dermal response to a given substance can be very different depending on the site of application. Therefore misjudgement of a skin reaction at one site (micro area) can easily occur if evaluated by comparison with a "reference reaction" at another site. This risk is inherent in the presently used "reference assessment" of skin reactions towards a test substance (e.g. an antigen), depending on the skin reactivity to two reference substances, histamine as a positive reference plus a solvent as a negative reference. However, much more compatible with skin physiology is the evaluation of a skin reaction exclusively at the injection site. A judgement if the skin reaction is positive or negative can be given by means of the development of the local reaction with time (30 min up to 24 hours) in comparison to the initial pustule caused exclusively by the injected volume (of 100 µL) without any skin reaction. The results obtained prompted us to suggest a more physiological performance plus a modified evaluation procedure ("kinetic assessment") of IDT. By these means IDT may well be a useful tool to support etiological diagnostics of type I allergic diseases: It provides information about functional sensitization of an individuals mast cells in vivo. Therefore it is essential to perform and assess skin reactions close to skin physiology.

Keywords: Intradermal test (IDT), assessment procedures of IDT, reference assessment, kinetic assessment, functional sensitization of mast cells

Wissenschaftliche Grundlagen

Einleitung

Verschiedene klinische Ausprägungen der Typ-I-Allergie führen beim Pferd zu so bedeutenden Erkrankungen wie dem anaphylaktischen Schock, der Urtikaria, dem Sommereczem und der rezidivierenden Atemwegsobstruktion. Daneben werden chronisch rezidivierende Konjunktividen, das Head-Shaking und allergisch bedingte Durchfallerkrankungen diskutiert.

Zur ätiologischen Diagnose einer Allergie werden einerseits in vivo Expositions- oder Provokationstests und andererseits in vitro unterschiedliche Tests durchgeführt. Bei den in vivo Tests werden dem Patienten Antigene entweder per Inhalationem (zur ätiologischen Diagnose der RAO) oder intrakutan (Sommereczem) zugeführt. Bei den in vitro Tests werden grundsätzlich Zelltests und serologische Tests unterschieden. Die Zelltests (Funktioneller in vitro Test zum Nachweis sensibilisierter Typ I allergischer Effektorzellen: FIT und Cellular

Antigen Stimulation Test®: CAST -) arbeiten mit „gewaschenem“ Vollblut, d. h. die freien Antikörper werden nahezu vollständig entfernt, so dass die Bedeutung nur solcher Antikörper untersucht wird, die zur Zeit der Untersuchung auf den Effektorzellen lokalisiert sind und damit am ehesten klinische Relevanz besitzen (Kaul 1998, Basalgia et al. 2006). Serologische Tests hingegen arbeiten mit freien Antikörpern und liefern nur wenig verlässliche Ergebnisse (Rees 2001, Lorch et al. 2001).

Der Intrakutantest (IKT) bietet die Möglichkeit, die Reaktionslage der Typ I-Effektorzellen der Haut (die Hautmastzellen), die u. a. für die Auslösung des Sommerekzems verantwortlich sind, zu untersuchen. Seine Bewertung wird jedoch häufig kritisch gesehen:

Schatzmann und Gerber protokollierten 1972 die Anwendung des Intrakutantests mit 16 verschiedenen Antigen-Päparationen bei 386 Pferden mit RAO. Sie stellten auffallend viele (40%) positive Ergebnisse fest und konnten keinen Unterschied zwischen allergieverdächtigen und unverdächtigen Tieren nachweisen.

Norman et al. (1973) beschrieben für den Menschen die Schwierigkeiten einer präzisen Diagnose auslösender Agentien allergischer Symptome und fassen sie wie folgt zusammen: 1. Positive Hauttest-Ergebnisse werden auch bei Patienten festgestellt, die abstreiten auf Kontakt mit dem entsprechenden Antigen allergisch zu reagieren. 2. Patienten mit charakteristischen allergischen Symptomen und positivem Ergebnis eines Schleimhaut-Provokationstests können im Intrakutantest negativ reagieren. 3. Identische Messwerte des Quaddel-Durchmessers können bei gleichen Extrakten abgelesen werden, die sich in ihrer Konzentration um das zehnfache bis hundertfache unterscheiden. 4. Der gleiche Extrakt in gleicher Konzentration, in verschiedene Hautbereiche injiziert, kann deutlich unterschiedliche Reaktionen (Werte des Quaddel-Durchmessers) hervorrufen. 5. Antigen-Extrakte können sich hinsichtlich ihrer Potenz von Herstellungscharge zu Herstellungscharge beträchtlich unterscheiden. 6. Die zur Anwendung im IKT stark verdünnt gelagerten Extrakte können mit der Zeit ihre Wirkung verlieren. 7. Im Patienten vorhandene Wirkstoffe, die Histamin-Rezeptoren blockieren, können das Ergebnis des Intrakutantests verfälschen.

Trotz aller dieser Schwierigkeiten hielten die Forscher fest, dass der IKT zu Unrecht verunglimpft wird und in der immunologischen Diagnostik wichtige Informationen bieten kann. Da damals keine anderen verlässlichen (in vitro) Diagnosemöglichkeiten zur Verfügung standen, forderten sie deswegen zur Analyse und Behebung der Schwachpunkte auf.

Das Verfahren zur Bewertung, ob das Ergebnis eines IKTs positiv oder negativ zu beurteilen ist, wurde 1990 von Fadok und Greiner ausführlich beschrieben. Es liegt vielen wissenschaftlichen und diagnostischen Untersuchungen zugrunde. Bezugspunkte dieser Bewertung sind die zeitgleich abgelesene negative Referenzsubstanz (= das Lösungsmittel der Antigene) und positive Referenzsubstanz (Histamin). Man bewertet den Quaddel-Durchmesser oder die Hautfaltungdicke einer Testsubstanz in Abhängigkeit von denen der Referenzsubstanzen (Dem Wert der Negativkon-

trolle wird dabei der Grad „0“ und dem des Histamins der Grad „4“ zugeordnet.). Ein Wert, der größer oder gleich der halben Summe aus den Messwerten von Lösungsmittel und Histamin ist, wird i. d. R. als positiv im Sinne einer allergischen Reaktion angesehen. Dieses Verfahren wurde, ausgehend von den Standardverfahren in der Human- (Dreborg 1989) und Kleintiermedizin (Reedy et al. 2001), auf die Pferdemedizin extrapoliert.

Daneben werden auch andere Verfahren angewendet. Diese unterscheiden sich ebenso stark voneinander wie die Beurteilung des oder der richtigen Ablesezeitpunkte. Die Protokolle reichen von einer einmaligen Ableseung zwischen 15 bis 30 Minuten p. inj. (Schatzmann und Gerber 1972) bis zur einmaligen Ableseung nach 24 Stunden (Lebis et al. 2002, Ferroglio et al. 2006).

Die Diskussion über zweckmäßige Ablesezeitpunkte, die Art des Bewertungsverfahrens und die Höhe von Grenzwerten (Cut offs) ist nicht beendet. Schatzmann und Gerber (1972), Baker und Quinn (1978), Anderson et al. (1991), Lebis et al. (2002) und Ferroglio et al. (2006) bezogen ihre Bewertung auf die Messwerte der Reaktionsflächen kurz vor (Hautfaltungdicke) oder nach der Injektion (Durchmesser). Die meisten anderen bewerteten ihre Messergebnisse in Bezug zu PBS und Histamin.

Wong veröffentlicht seit 2003 Ergebnisse seiner Studien über verschiedene Positivkontrollsubstanzen (Histamin, Phythämagglutinin (= PHA) und Compound 48/80) und versucht auf diese Weise, zur Etablierung eines allgemein gültigen Prozedere beizutragen. Daneben bestehen Bemühungen, die Präparation der Antigene zu standardisieren und, wenn möglich, auf definierte (möglichst rekombinant hergestellte) Einzelantigene umzustellen. (Ferroglio et al. 2006).

An der Einschätzung von Norman et al. (1973), der trotz aller Schwierigkeiten den IKT befürwortet, hat sich in den letzten 35 Jahren grundsätzlich nichts geändert. Die Frage nach der Rechtfertigung des IKTs stellt sich heute aus anderen Gründen: In der Pferdemedizin gibt es mittlerweile eine etablierte und standardisierte In vitro-Testmethode mit einem verlässlichen Aussagewert (FIT). Diese ist bisher nur begrenzt verfügbar und diagnostiziert andere Effektorzellen der Typ-I-Allergie (die basophilen Granulozyten im Blut). Die Aussagekraft des IKTs ist zudem gestiegen, nachdem man zu der Erkenntnis gelangt ist, dass mit ihm „nur“ eine funktionelle Sensibilisierung der Mastzellen und keine „allergische Erkrankung“ diagnostiziert werden. Die Bewertung der klinischen Relevanz muss im Zusammenhang mit der klinischen Untersuchung und dem Vorbericht getroffen werden (Jose-Cunilleras et al., 2001 und Rees 2001).

Obwohl bis heute keine einheitliche Methodik zur Durchführung und Bewertung des Intrakutantests etabliert werden konnte (Wong et al. 2005a, b und c), dient er teilweise als Grundlage für die Entscheidung über die Auswahl bestimmter Antigene für eine Hyposensibilisierung - mit für den Patienten nicht einzuschätzenden Folgen (Wong 2003).

Die vorliegenden Untersuchungen wurden durchgeführt, um die Zuverlässigkeit des IKT und seiner Bewertung zu überprüfen.

Material und Methoden

Tiere

Für diese Arbeit standen eine 24 köpfige Isländerherde und 6 Warmblutpferde zur Verfügung. Einige Tiere waren aus Island importiert worden, bei den übrigen Tieren handelte es sich um Nachzuchten aus dem Herdenverband. Es handelte sich um 20 Stuten, drei Wallache und einen Hengst, die nach Geschlecht getrennt unter nahezu identischen Bedingungen ganzjährig auf Weiden mit einem ausreichend großen, dreiseitig geschlossenen Unterstand gehalten werden.

Vorbereitung der sterilen Testsubstanzen

Eine positive Kontrollsubstanz (Histamin), eine negative Kontrollsubstanz (PBS) und je nach Versuchsansatz bis zu zwölf Antigene wurden in den verschiedenen Versuchsansätzen und Konzentrationen benutzt.

Die aus Insekten hergestellten löslichen Antigene wurden mit 1.000 Gy bestrahlt (in Zusammenarbeit mit der Medizinischen Hochschule Hannover), um sicher zu stellen, das eventuell in den Insekten enthaltene Krankheitserreger zuverlässig abgetötet waren. Sie wurden in PBS (pH 7,2) gelöst, über Sephadex G 10 Säulen von Histamin und anderen unerwünschten Begleitstoffen, wie Glycerin und anderen Konservierungsstoff befreit und durch 0,22 μm sterilfiltriert. Ihr Proteingehalt wurde anschließend bestimmt und als Antigenkonzentration angenommen. Bis zu ihrer Verwendung wurden sie bei -20°C gelagert.

Frühestens zwölf Stunden vor Durchführung des IKTs wurden die nötigen Gebrauchskonzentrationen durch Verdünnen mit sterilem PBS hergestellt. Histamin wurde jeweils frisch aus einer Trockensubstanz (annähernd 97% 2-(4-Imidazol)ethylamin p.a.) mit PBS auf eine Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ eingestellt. Die Antigene wurden mit PBS (pH 7,2) auf Konzentrationen von 50 und 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ eingestellt. Diese Lösungen werden bei 4°C gelagert. Frühestens drei Stunden vor Gebrauch wurden die Testsubstanzen mit einem Volumen von je 100 μl in Tuberkulin-Spritzen mit aufgesetzter 27 G x 3/4" Nadel blasenfrei aufgenommen und in einem Ständer - möglichst bei 20°C - so gelagert, dass eine Entleerung des Inhalts während des Transports nicht möglich war.

Vorbereitung der Probanden

Die Tiere wurden vor Beginn einer klinischen Allgemeinuntersuchung unterzogen. Das für den IKT vorgesehene Hautareal im Bereich des Halses oder der Sattellage wurde zunächst geschoren. Anschließend wurden diese Bereiche rasiert, gewaschen und mit unvergälltem Alkohol entfettet und desinfiziert. In einem Vorversuch wurde festgestellt, dass im Gegensatz zu vergälltem Alkohol der unvergällte wesentlich weniger unspezifische Reaktionen in Form flächiger Schwellungen bewirkt. Die Injektionsstellen wurden mit einem weißen Permanentmarker markiert. Dieser Stift ermöglicht eine witterungsunabhängige länger haltbare Markierung, die auch auf mit Alkohol entfetteter Haut haftet.

Durchführung des IKTs

Die Testsubstanzen wurden zügig nacheinander streng intrakutan im Abstand von mindestens 5 cm voneinander injiziert, wobei PBS als vorletzte und Histamin als letzte Substanz injiziert wurden, da Histamin die schnellste Reaktion zeigte. Die Injektion erfolgte unter Bildung einer Hautfalte, in die die Nadel in einem Winkel von $15-20^{\circ}$ mit dem Anschliff nach oben eingeschoben wird. Um reflektorische Hautzuckungen möglichst zu minimieren, verblieb eine Hand während des Spritzenwechsels permanent in Hautkontakt zur nächsten Injektionsstelle. Die richtige Einstichtiefe wurde durch Sichtkontrolle der entstandenen Quaddel kontrolliert. Quaddeln, deren Durchmesser nicht mindestens 5 mm betrug, wurden als Fehlinjektionen verworfen und an anderer Stelle wiederholt bzw. nicht ausgewertet. Unmittelbar nach der Injektion aller Antigene wurde der Durchmesser der Ursprungsquaddeln einer jeden Injektion mit einer leichtgängigen Schieblehre mit digitaler Maßangabe bestimmt (Messfehler $\pm 0,2\text{mm}$). Anschließend wurden die Durchmesser eine halbe, eine, zwei, drei, vier und ggf. 24 Stunden nach der Injektion gemessen.

Bei kreisrunden Quaddeln reichte eine Messung. Hingegen mussten bei ovalen oder unregulär auslaufenden Quaddeln der größte und kleinste Durchmesser bestimmt und ihre Summe dividiert durch zwei als Messwert protokolliert werden.

Bisher praktizierte Auswertung: Referenzverfahren

Fadok und Greiner beschrieben 1990 folgendes Verfahren: Der Durchmesser der Testsubstanz wird zu den Durchmessern der Kontrollsubstanzen rechnerisch ins Verhältnis gesetzt und anhand einer Skala von null (entspricht dem Messwert von PBS = Negativkontrolle) bis vier (entspricht dem Messwert von Histamin = Positivkontrolle) bewertet. Berechnungsergebnisse, die in die Skala gleich oder größer zwei eingeordnet werden, werden als positiv im Sinne einer Sensibilisierung der Haut angesehen. Ein Berechnungsergebnis von zwei ergibt sich, wenn der Durchmesser der Testsubstanz gleich oder größer als die Hälfte der Summe der Durchmesser von Positiv- und Negativ-Kontrolle ist.

Tabelle 1 zeigt anhand beispieldarstellender Messgrößen der Kontroll- und Testsubstanzen zu einem bestimmten Ableszeitpunkt die Berechnung der Durchmessergrößen, die die Grenzen der fünf verschiedenen Stufen bilden und die Grundlage für die Bewertung positiv oder negativ darstellen.

Prüfung des etablierten Verfahrens zur Durchführung und Bewertung des IKTs

Wiederholt wurden an denselben Tieren sowohl an verschiedenen Tagen, als auch zu verschiedenen Zeitpunkten am selben Tag stark unterschiedliche Hautreaktionen beobachtet, wodurch sich verschiedene qualitative Bewertungen der gleichen Testsubstanz ergaben. Zur Klärung, wie unterschiedlich die Ergebnisse eines IKTs am gleichen Tag am selben Pferd unter gleichen Bedingungen ausfallen können, wurden bei verschiedenen Tieren der Herde Intrakutantests mit Mehrfachansätzen durchgeführt:

Tab 1 Referenzverfahren zur Bewertung der Messgrößen von Quaddeldurchmessern (Ø)

Reference assessment parameters for evaluation of test pustules in comparison to positive and negative reference pustules

a = PBS negative Kontrollsubstanz Ø = 8 mm
 b = Histamin positive Kontrollsubstanz Ø = 20 mm
 c = Antigen „x“ Testsubstanz Ø = 12 mm
 Beispiel: Antigen „x“: Ø=12 mm, Stufe=1+, Bewertung= negativ

Stufe:	Bewertung:	Berechnungsweg:	Ø, den die Testsubstanz in diesem Beispiel haben müsste, um in die entsprechende Stufe eingeordnet zu werden
4	positiv	$c \geq b$	≥ 20 mm
3	positiv	$c \geq ((a+b)/2 + b)/2$ und < 4	≥ 17 mm und < 20 mm
2	positiv	$c \geq (a+b)/2$ und < 3	≥ 14 mm und < 17 mm
1	negativ	$c \geq (a+b)/4$ bzw. $> a$ und < 2	> 8 mm und < 14 mm
0,5	negativ	$c > a$ und $< (a+b)/4$	> 8 mm und < 14 mm
0	negativ	$c \leq a$	≤ 8 mm

Es wurden am selben Tier jeweils gleichzeitig an zwei verschiedenen Lokalisationen (Hals oder Sattellage der linken oder rechten Körperseite), im Folgenden auch als Makroflächen bezeichnet, ein IKT mit Doppel- und Dreifachansätzen der Kontroll- und Testsubstanzen durchgeführt.

Die Applikationsorte der einzelnen Substanzen innerhalb der Makroflächen werden im Folgenden auch als Mikroflächen (Injektionsstelle und unmittelbarer Umgebungsbereich) bezeichnet. Die Durchführung des IKT erfolgte wie oben beschrieben. Die Quaddeldurchmesser an jeder Injektionsstelle wurden dabei unmittelbar nach Applikation der Injektionsflüssigkeit (T = 0: Ausgangsquaddel), eine halbe Stunde danach sowie eine, zwei, drei, vier und 24 Stunden später gemessen.

Ergebnisse

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen lassen sich in vier Abschnitte gliedern:

- Zeitgleich durchgeführte identische Injektionen gleicher Substanzen können unterschiedliche Ergebnisse liefern: Diskordante Ergebnisse auf verschiedenen Makro- und Mikroflächen
- Aussagekraft des Referenzverfahrens bei diskordanten Ergebnissen
- Unterschiedliche Testsubstanzen verursachen sowohl individuell als auch substanzabhängig verschiedene Kinetiken, somit ergeben sich je nach gewähltem Ableszeitpunkt verschiedene Ergebnisse: Streuung der Verläufe der verschiedenen Testsubstanzen
- Grundlagen für ein modifiziertes Verfahren zur Durchführung und Bewertung des IKTs

Diskordante Ergebnisse auf verschiedenen Makroflächen

Injektionen identischer Test- und Kontrollsubstanzen in gleicher Konzentration und gleichem Injektionsvolumen können zeitgleich am selben Tier unterschiedlich lange und unterschiedlich stark reagieren. Dies gilt sowohl für die Testsubstanzen (Abb. 1), als auch für die Kontrollsubstanzen (Abb. 2). Abbildung 1 zeigt beispielhaft an einem Tier, dass in der linken Sattellage der Durchmesser der Histamin induzierten Quaddel innerhalb einer halben Stunde deutlich über die

Ausgangsquaddel hinaus ansteigt und für vier Stunden auf etwa diesem Niveau verbleibt. Dieselbe Histaminlösung – sukzessiv injiziert - verursacht in der rechten Sattellage eine etwa gleich große Ausgangsquaddel (T=0) wie auf der linken

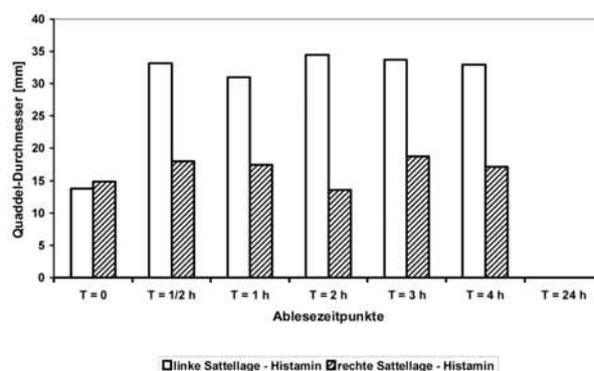


Abb 1 Unterschiedliche Quaddel-Durchmesser auf 2 Makroflächen (linke und rechte Sattellage) am selben Tier bei Injektion von 100 µL der gleichen positiven Kontrollsubstanz (Histamin) zeitlich unmittelbar hintereinander.

Discordant diameters of pustules at 2 macro areas (left and right shoulder) of the same animal caused by subsequent intradermal injection of 100µL of histamine solution, each.

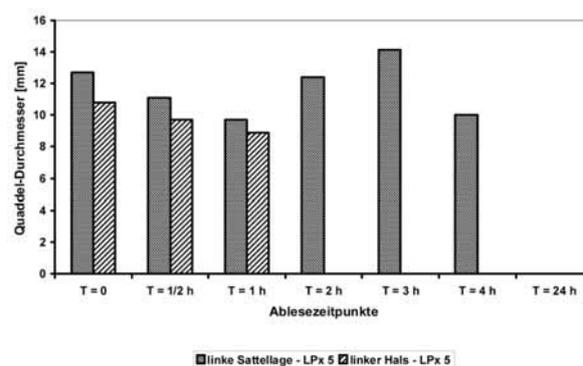


Abb 2 Unterschiedliche Entwicklung und Dauer der Messbarkeit von Quaddeln auf 2 Makroflächen (Sattellage und Hals) desselben Tieres nach sukzessiver intrakutaner Injektion von je 100 µL derselben Antigenlösung (5 µg/mL einer Pollenmischung von spät blühenden Pflanzen)

Discordant development and persistence of pustules at two macro areas (shoulder and neck) of the same individual upon subsequent intradermal injection of 100 µL of an identical soluble antigen preparation (5 µg/mL of a late pollen mix).

Seite. Die anschließende lokale Hautreaktion fällt rechts hingegen deutlich schwächer aus als links und bleibt auch für die nächsten 4 Stunden auf diesem niedrigen Niveau.

Abbildung 2 gibt ein Beispiel dafür wider, wie unterschiedlich sich die Quaddeln identischer Injektion von Testsubstanzen entwickeln können: Am linken Hals nahm die durch i. c. Applikation entstandene Quaddel in ihrem Durchmesser über eine Stunde um ca. 2 mm ab und war nach zwei Stunden nicht mehr messbar. Die Quaddel in der linken Sattellage erfuhr zunächst ebenfalls eine Abnahme – hier um ca. 3 mm –, stieg dann jedoch über die Ausgangsquaddel hinaus an und war auch in der vierten Stunde p. appl. noch deutlich messbar.

Diskordante Ergebnisse auf verschiedenen Mikroflächen

Auch auf dicht benachbarten Körperstellen können die Ergebnisse identischer unmittelbar nacheinander verabreichter Injektionen stark unterschiedlich ausfallen. Die folgenden zwei Abbildungen (Abb. 3 und 4) zeigen dies beispielhaft:

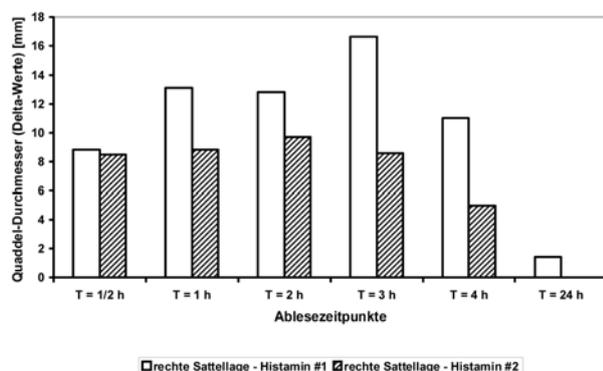


Abb 3 Unterschiedliche Anstiege der Quaddel-Durchmesser über die Ausgangsquaddel hinaus auf 2 Mikroflächen innerhalb derselben Makrofläche (rechte Sattellage) bei sukzessiver Injektion von je 100 μ L der Kontrollsubstanz Histamin (100 μ g/mL PBS). *Different increase in diameter of reaction pustules above their initial pustule at two micro areas within the same macro area (right shoulder) upon subsequent injection of 100 μ L of histamine solution (100 μ g/mL PBS).*

Abb. 3 zeigt, dass eine Quaddel an einer Injektionsstelle (Mikrofläche) über drei Stunden eine mehr oder minder stetige Zunahme um fast 16 mm zeigt und auch nach 24 Stunden noch größer als die Ausgangsquaddel ist. Die Quaddel an der benachbarten Injektionsstelle auf derselben Makrofläche hingegen steigt auf eine identische Injektion in der ersten halben Stunde ebenfalls um 8 mm über die Ausgangsquaddel an, bleibt dann aber für drei Stunden auf diesem Niveau und ist zum letzten Mal in der vierten Stunde p. appl. mit einer reduzierten Größe von ca. 4 mm über der Ausgangsquaddel messbar.

Abb. 4 zeigt exemplarisch deutliche Unterschiede nach sukzessiver Injektion von je 100 μ L einer Antigenlösung aus der Pferdebremse in einer Konzentration von 50 μ g/mL zwischen zwei Mikroflächen derselben Makrofläche (rechte Sattellage): An einer Mikrofläche (#1) bewirkte das Antigen einen Anstieg des Durchmessers gegenüber der Ausgangsquaddel (T=0) um bis zu 4 mm bis zur vierten Stunde. An der benachbarten anderen Mikrofläche (#2) stieg

gleichzeitig die durch Applikation entstandene Quaddel in der ersten halben Stunde um ca. 2 mm an, wurde danach jedoch kleiner und war ab der vierten Stunde nicht mehr messbar.

Aussagekraft des Referenzverfahrens bei diskordanten Ergebnissen

Die Feststellung, dass sowohl die Test- als auch die Kontrollsubstanzen abhängig von der Injektionsstelle am selben Tier zeitgleich deutlich unterschiedliche Ergebnisse liefern können, wirft zwei Fragen auf:

- Welche Aussagekraft besitzt eine einzige Injektion einer Testsubstanz pro Tier?
- Ist es gerechtfertigt, Injektionen an drei unterschiedlichen Stellen (die Kontrollsubstanzen Histamin und PBS [= Injektionen an den Mikroflächen #1 und #2] als Referenzen für eine Testsubstanz [= Injektion an Mikrofläche #3]) untereinander in Bezug zu setzen?

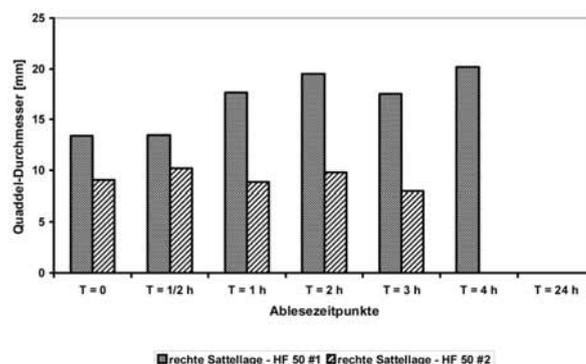


Abb 4 Unterschiedliche Entwicklung und Dauer der Messbarkeit der Quaddel-Durchmesser auf zwei Mikroflächen innerhalb derselben Makrofläche bei sukzessiver Injektion von je 100 μ L derselben Antigenlösung (50 μ g/mL Extrakt aus der Pferdebremse = horse fly: HF). *Discordant development and persistence of pustules at two micro areas within the same macro area (right shoulder) of the same horse upon subsequent injection of 100 μ L of an identical soluble antigen preparation (50 μ L/mL of horse fly extract: HF).*

Die letzte Frage ist deswegen von übergeordneter Bedeutung, weil der Bezug dreier verschiedener Injektionen zueinander als derzeit häufig angewandte Bewertungsmethode des IKTs (= Referenzverfahren) in der Literatur zu finden ist.

Die Problematik dieses Vorgehens soll an einem Testergebnis verdeutlicht werden. Dazu werden zunächst die Messergebnisse der Kontrollsubstanzen (Histamin und PBS) und zweier Testsubstanzen (hier: m α eqIgE = Mäuse Antikörper mit Spezifität gegen (anti) equines IgE und MMx = Mold Mix, lösliche Antigenpräparation aus fünf verschiedenen Schimmelpilzarten) selbst gezeigt (Abb. 5a und Abb. 5b) und diese anschließend mittels des Referenzverfahrens bewertet (Tab. 2).

Um die Problematik der Bewertung aufgrund des Bezugs auf Kontrollsubstanzen zu verdeutlichen, werden in Tab. 2 die Ergebnisse mit den Testsubstanzen sowohl anhand der seitengleichen Ergebnisse der Kontrollsubstanzen bewertet (oberer Teil der Tab. / seitengleiche Bewertung) als auch anhand der

Tab 2 Bewertung der Messergebnisse nach dem Referenzverfahren. Die grau unterlegten Beurteilungen ergeben sich für identische Testwerte, jedoch verglichen mit anderen zeitgleichen Referenzwerten am selben Tier.

Evaluation of pustule diameters by means of reference assessment. Identical diameters of test pustules were assessed in comparison to the reference pustules of their macro area (upper part) as well as to those of a macro area at the other side of the same animal. Shaded areas: change invading

Testsubstanz und Körperseite, auf der injiziert wurde	Körperseite, von der die Referenzsubstanz zur Bewertung herangezogen wurde	Bewertung nach				
		½ h	1 h	2 h	3 h	4 h
Seitengleiche Bewertung						
m α eq IgE, links	links	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
m α eq IgE, rechts	rechts	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
MMx, links	links	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
MMx, rechts	rechts	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
Seitenengleiche Bewertung						
m α eq IgE, links	rechts	neg.	neg.	pos.	pos.	pos.
m α eq IgE, rechts	links	neg.	pos.	neg.	pos.	pos.
MMx, links	rechts	neg.	neg.	neg.	pos.	pos.
MMx, rechts	links	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.

Ergebnisse der Kontrollsubstanzen der jeweils anderen Körperseite (unterer Teil der Tab. / seitenengleiche Bewertung). Der untere Teil der Tab. 2 zeigt, dass identische Meßwerte der Testsubstanzen allein aufgrund eines anderen Injektionsortes der Kontrollsubstanzen eine qualitativ andere Bewertung erfahren können.

Streuung der Verläufe der verschiedenen Testsubstanzen

Um die Verläufe der Quaddel-Durchmesser verschiedener Antigene zu erfassen, wurden insgesamt 1.044 Injektionen verschiedener Antigene in den Verdünnungen 50 und 5 µg/mL PBS von 130 IKTs an 24 verschiedenen Pferden her-

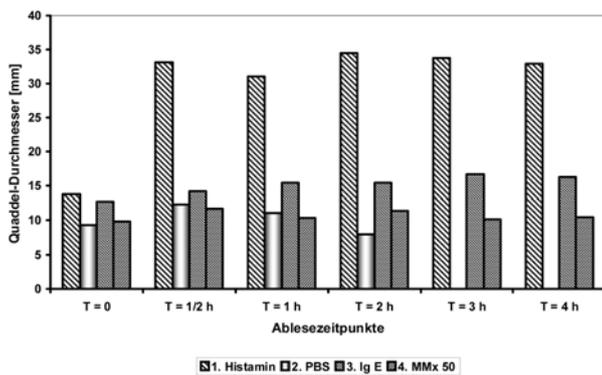


Abb 5a Zeitgleiche Ergebnisse der Quaddeldurchmesser in der linken Sattellage
Contemporary results regarding pustule diameters at the left shoulder

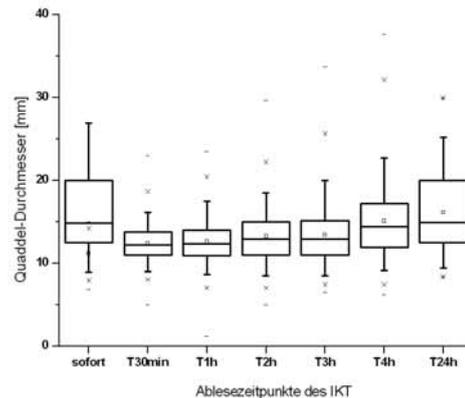


Abb 6 Verlauf der Quaddel-Durchmesser nach 1.044 i. c Injektionen verschiedener Antigene in 130 IKTs. Im Boxplot dargestellt sind Mittelwert (kleines Quadrat), der Medianwert (horizontale Linie im Rechteck), das 25 % und 75 % -Quantil (untere und obere Begrenzung des großen Rechteck), das 95% und 98 % -Quantil (unterer und oberer kleiner Querstrich am Ende der senkrechten Linien und x) sowie der Minimal - und der Maximalwert (unterer und oberer freier kleiner Querstrich) zum jeweiligen Messzeitpunkt.

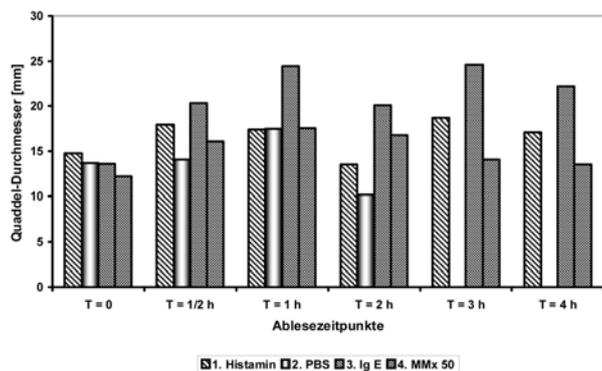


Abb 5b Zeitgleiche Ergebnisse der Quaddeldurchmesser in der rechten Sattellage desselben Tieres wie in Abb. 5a.
Contemporary results regarding pustule diameters at the right shoulder of the same animal as in fig. 5a.

Summarized kinetic of pustules generated by 1,044 intradermal injections of different antigens in a total of 130 IDTs. The box plot indicates the mean (small square), the median (horizontal bold line within the oblong, the 25% and 75% -quantile (lower and upper limit of the oblong), the 95% and 98% -quantile (lower and upper small horizontal line at the end of the vertical bar and the x, respectively) as well as the minimal and maximal value (small free horizontal line) at each time point.

angezogen. Abb. 6 zeigt die Streuungen der durch die Testsubstanzen induzierten Quaddeln.

Die erheblich streuenden Werte bedeuten, dass sich nicht nur individuell verschiedene Kinetiken abspielen, sondern auch Antigen abhängig verschiedene Verläufe auftreten. Diese Vielfältigkeit lässt sich durch eine einzige oder lediglich zwei Ablesungen des IKTs nicht erfassen.

Grundsätzlich verursachen die Testsubstanzen nicht nur individuell stark unterschiedliche Verläufe, sondern besitzen ein ihnen eigenes „Reaktionsmuster“, das die Eingrenzung auf bestimmte, wenige Ablesezeitpunkte erschwert. Abb. 7 zeigt diese „Verlaufsmuster“ anhand drei verschiedener Testsubstanzen: Für diese Darstellung wurden insgesamt 1.044 Injektionen verschiedener Antigene in den Verdünnungen 50 und 5 µg/mL PBS von 130 IKTs an 24 verschiedenen Pferden herangezogen. Dargestellt sind die Auswertungen von nur drei unterschiedlichen Antigenen, die jeweils in einer Konzentration von 50 µg/mL injiziert wurden. Zur Darstellung wurden die Messwerte herangezogen, deren Daten im 96% - Bereich lagen. Um die Kinetik besser zu verdeutlichen, werden nur die Zunahmen gegenüber den Ausgangs-Quaddeln – also positive Delta-Werte – dargestellt. Aufgrund der unterschiedlichen Kinetiken der Testsubstanzen, die individuell und substanzbedingt zeitlich variieren können, muss ein IKT zu mehreren Zeitpunkten im Zeitraum 0 bis 24 Stunden abgelesen werden. Nur so können möglichst alle Reaktionen mit unterschiedlichen Kinetiken erfasst werden.

Grundlagen für ein modifiziertes Verfahren zur Durchführung und Bewertung des IKTs

Aufgrund der Nicht-Vergleichbarkeit verschiedener Injektionsstellen untereinander, ist eine zuverlässigere und biologisch

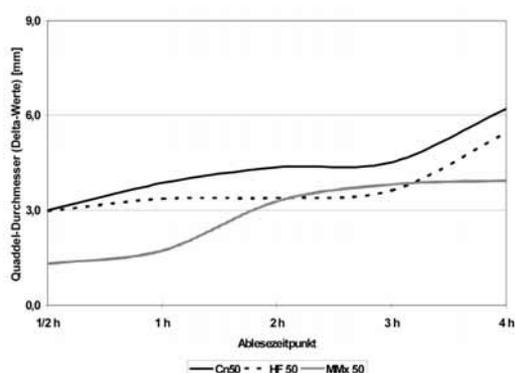


Abb 7 Verschiedene Antigene bewirken eine zeitlich und quantitativ unterschiedliche Zunahme ihrer Quaddel-Durchmesser über die Ausgangsquaddel hinaus. Cn 50: hier ein „früh reagierendes“ Antigen (*Culicoides nubeculosus*: Cn), das bereits nach 30 min deutliche Zunahmen bewirkte und mit der Zeit kontinuierlich weiter anstieg mit Ausnahme eines Plateaus zwischen der 2. und 3. Stunde. HF 50: hier ebenfalls ein „früh reagierendes“ Antigen (Pferdebremse = horse fly: HF), das bereits nach 30 Min deutliche Zunahmen bewirkte, anschließend für 2,5 Stunden nahezu horizontal verlief und - ähnlich Cn - ab der 3. Stunde einen weiteren Anstieg erfuhr. MMx 50: diese Pilzmischung (mold mix: MMx) zeigte sich als ein „spät reagierendes“ Antigen, das erst ab der zweiten Stunde eine deutliche Größenzunahme über die Ausgangsquaddel hervorrief.

*Different antigens cause time dependently and quantitatively different increase in the diameter of their pustule above the initial pustule. Cn 50: showed up as an "early reacting" antigen (*Culicoides nubeculosus*: Cn) in this animal. Within 30 min. it caused a considerable increase plus it continued with time except between 2 and 3 hours, where it had a plateau. HF 50: proved as an "early reacting" antigen as well (horse fly: HF) by causing a strong increase within the first 30 min. Subsequently, however, it levelled off for 2.5 hours before causing a late reaction. MMx 50: stands for mold mix and showed a delayed onset of reaction commencing only after 1 hour and exceeding the initial pustule clearly after two hours.*

relevantere Bewertung einer Hautreaktion im IKT eher durch die Beurteilung der Kinetik der Hautreaktion über die Zeit anhand der lokalen Quaddelentwicklung jeweils an der Injektionsstelle selbst erforderlich.

Zur Beantwortung der Frage, wie man an einer Injektionsstelle alleine erkennen kann, ob hier eine positive immunologische Hautreaktion stattgefunden hat oder nicht, gingen wir von dem Folgenden aus: Das intrakutan (i.c.) injizierte Flüssigkeitsvolumen (z.B. 100 µL) verursacht zuerst eine Quaddel, ohne dass eine Immunreaktion stattfindet (= Ausgangsquaddel, reine Volumenquaddel). Auf ihre Größe (Durchmesser in mm) beziehen sich alle weiteren Messwerte an dieser Injektionsstelle. Mit zunehmender Zeit (deswegen Kinetikverfahren) nach der Injektion (30 Min. bis mehrere Stunden) wird die Größe der Quaddel durch die immunologische Reaktion auf die injizierte Substanz bedingt (= Reaktionsquaddel). Zur Bewertung kommen nur positiven Differenzwerte von der Ausgangs- zur Reaktionsquaddel.

Da die Positivkontrolle (Histamin) am schnellsten eine Reaktionsquaddel verursacht, sollte sie als letzte Injektion verabreicht werden, um dort sofort mit der Messung der Ausgangsquaddeln zu beginnen.

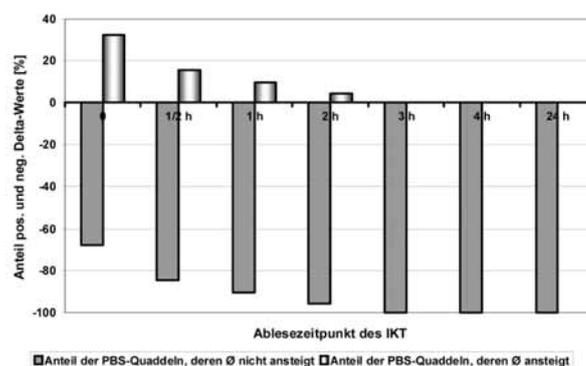


Abb 8 Relativer Anteil der PBS-Quaddeln, deren Durchmesser gegenüber der Ausgangsquaddel mit der Zeit ansteigt bzw. abfällt. *Relative amount of PBS pustules exceeding their initial pustule with time.*

Ist jeder Anstieg über die Ausgangsquaddel eine positive Hautreaktion? Herleitung eines sicheren Grenzwertes („Cut-off“)

Bei unseren Untersuchungen war aufgefallen, dass auch die durch Injektion von sterilem PBS (Negativkontrolle) verursachten Ausgangsquaddeln mit der Zeit in ihrem Durchmesser ansteigen können, also ein falsch positives Ergebnis darstellen würden (Abb. 8). Deswegen musste ein Grenzwert gefunden werden, der sicher unter unseren Bedingungen (d. h. mit den uns zur Verfügung stehenden Antigen-Präparationen) nur einen solchen Durchmesser-Anstieg als positiv bewertet, der sicher eine Zunahme über die Volumen-Quaddel durch das Lösungsmittel (hier PBS) alleine hinaus erwarten lässt.

Den Grenzwert für den Anstieg haben wir durch Auswertung der Volumen-Quaddeln des Lösungsmittels PBS errechnet.

Tab 3 Bestimmung der Grenzwerte zur sicheren Differenzierung positiver Reaktionsquaddeln auf Testsubstanzen von unspezifischen Reaktionen auf das Lösungsmittel PBS.*Determination of cut off values for reliable discrimination between a positive reaction to test substances and unspecific reactions to the solvent*

Anzahl der ausgewerteten IKTs (n =)	130
Anzahl gemessener PBS-Quaddeln (= n mal Anzahl der Ablesezeitpunkte = 6)	780
Anzahl der mit der Zeit vergrößerten PBS-Quaddeln (96%-Bereich)	70
Mittelwert (= MW) der PBS Delta-Werte	0,78 mm
Standardabweichung (= SW)	0,47 mm
3 fache SW	1,41 mm
6 fache SW	2,82 mm
MW + 3 fache SW	2,19 mm
MW + 6 fache SW	3,60 mm

Tab. 3 zeigt die Herleitung des Grenzwertes zur Differenzierung von unspezifischen Reaktionen auf das reine Lösungsmittel (hier PBS) und positiven Reaktions-Quaddeln auf Testsubstanzen. Es wurden insgesamt 130 IKTs ausgewertet, bei denen PBS mit einem Volumen von je 100 µL intrakutan injiziert worden war. Die Durchmesser der Quaddeln wurden unmittelbar nach Injektion (T = 0), eine halbe Stunde danach sowie eine, zwei, drei, vier und 24 Stunden später abgelesen. Bei den insgesamt 780 Messungen (= 130 verschiedene PBS-Injektionen mit je sechs Ablesungen p. inj.) traten 70 Werte von PBS-Quaddeln im 96%-Bereich auf, deren Durchmesser gegenüber dem der jeweiligen Ausgangsquaddel angestiegen war, die also einen positiven Delta-Wert hatten. Diese 70 Werte dienten als Berechnungsgrundlage für die statistischen Größen, aus denen sich ein Grenzwert errechnen lässt.

Auf Grund dieser Berechnungen wird der Durchmesser-Anstieg einer Testsubstanz (Antikörper oder Antigene) über ihre Ausgangsquaddel (positiver Deltawert) um 2,2 mm (MW der 70 positiven PBS Delta-Werte plus 3-fache SW) oder mehr aber weniger als 3,6 mm als eine möglich positive Reaktion mit der Bewertungszahl von 0,5 eingestuft und ein Anstieg um 3,6 mm (MW der 70 positiven PBS Delta-Werte plus 6-fache SW) oder mehr als eine deutlich positive Reaktion mit der Bewertungszahl von 1,0 bewertet.

Als Beispiel werden die Messwerte eines Intrakutantests vergleichend anhand der beiden unterschiedlichen Bewertungsverfahren beurteilt. Dazu werden zunächst die Messwerte und die daraus errechneten Delta-Werte in einer Tabelle 4a aufgelistet. In der zweiten Tabelle 4b werden sie dann einerseits mittels Referenzverfahren im Vergleich zu den Kontrollsubstanzen Histamin und PBS (= Referenzsubstanzen) und andererseits mittels Kinetikverfahren unabhängig von Referenzsubstanzen nach der zeitabhängigen Quaddelkinetik bewertet, indem allein die Größenzunahme gegenüber der Ausgangsquaddel an jeder Injektionsstelle beurteilt wird.

Diese Tabelle zeigt in der linken Hälfte von 4b die positiven Bewertungen nach dem Referenzverfahren (Bewertungszahl ≥ 2). Die Zusammenfassung (= Zsf.) gibt die Gesamtbewertung des IKT für eine Testsubstanz in einer Konzentration an einer Mikrofläche wieder, die alle Ablesezeitpunkte zusammen berücksichtigt: War für eine Testsubstanz eine Bewertung mindestens einmal positiv (egal wann und wie oft), so wird der Proband für diese Substanz als positiv im Sinne einer Sensibilisierung betrachtet.

Der rechte Teil dieser Tabelle 4b zeigt die Bewertung anhand des Kinetikverfahrens: Werte von 0,5 sind möglich positive Ergebnisse (Delta-Werte gleich oder größer als 2,2 mm und kleiner als 3,6 mm), Werte von 1 zeigen deutlich positive Ergebnisse (Delta-Wert gleich oder größer als 3,6 mm). Auch hier gibt die Zusammenfassung (= Zsf.) die Gesamtbewertung des IKT für eine Testsubstanz in einer Konzentration an einer Mikrofläche des IKT wider, die alle Ablesezeitpunkte zusammen berücksichtigt: Allerdings werden hier die Einzelergebnisse addiert und alle Summen, die gleich oder größer als 1 sind (das können auch zwei möglich positive Ergebnisse - 2 mal 0,5 - sein), werden als positiv im Sinne einer funktionellen Sensibilisierung der Mastzellen angesehen.

Aus dem Beispiel in Tab. 4 wird deutlich, welche qualitativ unterschiedlichen Aussagen sich aus der Bewertung identischer Messwerte (Quaddelgrößen durch Hautreaktionen) ergeben können: Die weitgehende Übereinstimmung beider Bewertungsverfahren in der Gesamtbeurteilung der Reaktionen an der linken Halsseite kommen hauptsächlich dadurch zustande, dass zur Ablesung an Stunde 2 der positive Referenzwert (Histamin) relativ gering (23,6 mm) und der negative Referenzwert (PBS) auf 0 zurückgegangen war. Wäre der Histaminwert wie bei Stunde 3 (30,7 mm) schon zur 2. Stunde ausgefallen, wären alle jetzt mit 2 bewerteten Reaktion negativ gewesen, bis auf HF 50. D.h. nicht die eigentliche lokale Hautreaktion auf die Testsubstanz entscheidet, ob sie positiv oder negativ bewertet wird, sondern die Größe der positiven und negativen Referenzreaktionen. Den Gegensatz zeigt das Kinetikverfahren (4a+b – rechts), in dem die Stärke der lokalen Hautreaktion auf die Testsubstanz allein über eine positive oder negative Bewertung entscheidet. Dies belegen die Bewertungszahlen zu unterschiedlichen Ablesezeitpunkten.

Noch eindrucksvoller wird die Bewertung der identischen Messwerte in der linken Sattellage: Allein auf Grund der etwas erhöhten Quaddeldurchmesser der Histaminreferenz und vor allem der hier relativ lang anhaltenden PBS-Referenzquaddel, wird im Referenzverfahren (4b – links) keine der deutlichen Hautreaktionen auf die Testsubstanzen als positiv bewertet, obwohl sie gleich oder größer als die positiv bewerteten Hautreaktionen zu Stunde 2 im Halsbereich sind. Da das Kinetikverfahren unabhängig von diesen Referenzquaddeln ist, werden die deutlichen lokalen Reaktionen auf die Testsubstanzen hier auch entsprechend positiv bewertet (4b – rechts). Somit kommt es im Gegensatz zum Referenzverfahren beim Kinetikverfahren zu einer weitgehend übereinstimmen-

Tab 4 Ergebnisse eines IKT an 2 Makroflächen desselben Tieres und die Bewertung identischer Messwerte nach dem Referenzverfahren sowie nach dem Kinetikverfahren. Histamin und PBS sind die positive und negative Kontrollsubstanz. Die Testsubstanzen sind Antigenpräparationen aus *Culicoides nubeculosus* (Cn), aus der Stubenfliege (DF), aus Milben (Dpt = *Dermatophagoides pteronyssinus*) und aus der Pferdebremse (HF), jeweils in Konzentrationen von 5 und 50 µg/mL in PBS. T = Ablesezeitpunkte. T0 = sofortige Ablesung nach Injektion (volumenbedingte Ausgangsquaddel ohne Reaktion der Haut). Zahlenangaben im oberen Tabellenteil (4a): mittlerer Quaddeldurchmesser (links) bzw. positive Delta-werte zur Ausgangsquaddel (rechts), beide in mm. Zahlenangaben im unteren Tabellenteil (4b): Bewertungszahlen. Zsf = zusammenfassende Bewertung aller Bewertungszahlen für jede Mikrofläche (Injektionsstelle und enge Umgebung) - links für das Referenzverfahren, rechts für das Kinetikverfahren.

Results of an IDT contemporarily performed at two macro areas of the same individual. Identical measuring values were appraised by means of the reference assessment as well as by the kinetic assessment. Histamine and PBS are the positive and negative reference or control substances, respectively. Test substances comprised soluble antigen preparations from *Culicoides nubeculosus* (Cn), domestic fly (DF), from mites (Dpt = *Dermatophagoides pteronyssinus*) and from horse fly (HF). Each test substance was submitted in concentrations of 5 and 50 µg/mL of PBS. T = time point of reading the pustules. T0 = reading the initial pustule caused solely by the injected volume of 100 µL immediately after injection. At each time point of reading the mean diameter of pustules is given in Tab. 4a - left part. From there the positive delta values were calculated by subtracting the diameter of the initial pustule from that of the reaction pustule for each micro area (Tab. 4a - right). Tab. 4b shows the scoring plus an overall assessment (Zsf.) for each micro area and antigen concentration by means of the reference assessment (left) and the kinetic assessment (right).

	Substanz	Durchmesser [mm]							Delta-Werte der Durchmesser [mm]						
		T 0	1/2 h	1 h	2 h	3 h	4h	24 h	1/2 h	1 h	2 h	3 h	4 h	24 h	
linker Hals	Histamin	11,2	26	26,2	23,6	30,7	23,7	0	14,8	15	12,4	19,5	12,5	0	
	PBS	10,1	9,6	7,9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Cn 5	12,8	11,5	11,3	12,1	12,1	9,6	0	0	0	0	0	0	0	
	Cn 50	12,1	11,2	13,8	15,1	15	14,1	0	0	1,7	3	2,9	2	0	
	DF 5	10,9	10,5	13,8	11,3	9,3	0	0	0	2,9	0,4	0	0	0	
	DF 50	12	14,5	16,2	12,8	13,4	15,6	0	2,5	4,2	0,8	1,4	3,6	0	
	Dpt 5	12	10,1	10,7	12,5	0	0	0	0	0	0,5	0	0	0	
	Dpt 50	8,2	11,3	11,2	12,7	0	0	0	3,1	3	4,5	0	0	0	
	HF 5	9,3	11,6	12,3	12,3	0	0	0	2,3	3	3	0	0	0	
HF 50	12,2	16,4	16,2	16	0	0	0	4,2	4	3,8	0	0	0		
linke Sattelage	Histamin	13,2	29,3	33,3	34,9	35,4	33,4	31,4	16,1	20,1	21,7	22,2	20,2	18,2	
	PBS	13,6	15,5	14,3	15,7	13,6	12,6	10,9	1,9	0,7	2,1	0	0	0	
	Cn 5	11,9	13	13,3	12,6	14,3	16,7	0	1,1	1,4	0,7	2,4	4,8	0	
	Cn 50	12,4	14,9	15,2	14	14,7	18,5	0	2,5	2,8	1,6	2,3	6,1	0	
	DF 5	12,1	13,6	14,2	12,8	11,5	12,4	0	1,5	2,1	0,7	0	0,3	0	
	DF 50	12,1	16,4	15,5	15,1	14,4	16,7	20	4,3	3,4	3	2,3	4,6	7,9	
	Dpt 5	12,8	12,6	14,1	12,9	13,3	12,4	13,9	0	1,3	0,1	0,5	0	1,1	
	Dpt 50	12,8	15,3	15,4	15,5	14,7	16,3	20,7	2,5	2,6	2,7	1,9	3,5	7,9	
	HF 5	11,6	14,1	12,8	12,5	13,3	13,9	0	2,5	1,2	0,9	1,7	2,3	0	
HF 50	12,1	20,3	19,7	17,5	17	19,5	29,9	8,2	7,6	5,4	4,9	7,4	17,8		

	Substanz	Bewertung nach dem Referenzverfahren							Bewertung nach dem Kinetikverfahren (Cut-off: 2,2 bzw. 3,6 mm)						
		T = 1/2 h	T = 1 h	T = 2 h	T = 3 h	T = 4 h	T = 24 h	Zsf.	T = 1/2 h	T = 1 h	T = 2 h	T = 3 h	T = 4 h	T = 24 h	Zsf.
linker Hals	Histamin														
	PBS														
	Cn 5			2				pos.							
	Cn 50			2		2		pos.			0,5	0,5			pos.
	DF 5									0,5					
	DF 50			2		2		pos.	0,5	1			0,5		pos.
	Dpt 5			2				pos.							
	Dpt 50			2				pos.	0,5	0,5	1				pos.
	HF 5			2				pos.	0,5	0,5	0,5				pos.
HF 50			2				pos.	1	1	1				pos.	
linke Sattelage	Histamin														
	PBS														
	Cn 5											0,5	1		pos.
	Cn 50								0,5	0,5		0,5	1		pos.
	DF 5														
	DF 50								1	0,5	0,5	0,5	1	1	pos.
	Dpt 5														
	Dpt 50								0,5	0,5	0,5		0,5	1	pos.
	HF 5								0,5				0,5		pos.
HF 50						3	pos.	1	1	1	1	1	1	pos.	

den Bewertung der Hautreaktionen auf die identischen Testsubstanzen im Hals- wie im Sattelbereich.

Diskussion

Subjektivität der Messung

Jedes Messverfahren einer Quaddelgröße oder Hautfaltdicke birgt die Gefahr einer subjektiven Beeinflussung durch den Untersucher. Die teilweise unscharf begrenzten Quaddeln und ihre unregelmäßige Form werden zwangsläufig durch verschiedene Untersucher anders in ihrer Ausdehnung beurteilt. Häufiges Üben minimiert dieses Problem. Objektivierende technische Messverfahren wie die Laser-Dopplertechnik, die den Blutfluss in einer Quaddel bestimmen oder die Ultraschall-Technik, die die Messung von Fläche, Dicke und Volumen einer Quaddel ermöglichen (Dreborg 1989) sind bisher nur wissenschaftlichen Untersuchungen vorbehalten. Man könnte versuchen sie in der Pferdemedizin zu etablieren, wenn sie denn informativer wären und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse verbessern würden.

Das eigentliche Problem des IKT liegt jedoch nicht im Messverfahren der entstandenen Hautreaktionen. Problematisch ist vielmehr, dass bisher häufig nur eine Injektion eines Antigens an einer Stelle des Patienten durchgeführt wird. Das Ergebnis dieser einzigen Messung wird als repräsentativ angesehen und auf den gesamten Organismus extrapoliert. Zeitgleich (Norman et al. 1973) oder zeitnah (Lebis et al. 2002) durchgeführte Intrakutantests, die ein anderes Ergebnis an anderer Lokalisation desselben Pferdes erbringen, müssen dann irritieren, obwohl sie einen physiologischen Vorgang widerspiegeln.

Prinzip der Heterogenität der Ergebnisse von Intrakutantests

Das Phänomen, dass zeitgleich und zeitnah replikativ durchgeführte Intrakutantests unterschiedliche Ergebnisse liefern können, wurde in der Humanmedizin bereits in den 30er Jahren des 20. Jahrhunderts beschrieben: Walzer (1936) und Alexander (1931) beschreiben die Möglichkeit, dass „der gleiche Extrakt, in verschiedene anatomische Hautbereiche injiziert, unterschiedliche Reaktionsgrößen hervorrufen kann“. Das Prinzip der Heterogenität der Ergebnisse begründet sich in verschiedenen Mechanismen: Dermale Mastzellen besitzen keinen einheitlichen Antikörperbesatz. Dieser unterscheidet sich nicht nur in seiner absoluten Ausstattung, sondern auch in seiner funktionellen Sensibilisierung: Dichte des Antikörperbesatzes der Mastzelloberfläche und dem Verhältnis des Besatzes aktivierender und inhibierender Fc Rezeptoren (Galli et al., 2005). Der Histamingehalt der Mastzellen kann zudem von Zelle zu Zelle stark schwanken (Church et al., 1998). Außerdem unterliegen die Mastzellen verschiedener Lokalisationen potentiell unterschiedlichen regulativen Einflüssen ihrer Nachbarzellen und humoraler Substanzen (Mars-hall 2004 und Galli et al. 2005).

Es ist damit physiologisch, dass die Haut auf den gleichen Stimulus im IKT an verschiedenen Lokalisationen zeitgleich sehr unterschiedlich reagieren kann. Welcher Art diese Unterschiede sein können, wurde in den vorliegenden Untersuchungen ausführlich erarbeitet. Dabei wurden sowohl makro- als auch mikrolokale Unterschiede betrachtet.

Es stellten sich zwei wichtige Erkenntnisse heraus, die für die Bewertung des IKTs von großer Bedeutung sind:

- Die Bewertung einer Testsubstanz anhand von Referenzsubstanzen ist unzulässig, da sie an unterschiedlichen Lokalisationen erfolgt.
- Es müssen mehrere identische Injektionen eines Antigens je Konzentration zeitgleich an mehreren Injektionsstellen durchgeführt werden, um die Wahrscheinlichkeit zu minimieren, auch bei einem positiv sensibilisierten Tier nur schwache oder keine lokale Reaktionen zu erhalten und dadurch eine falsch negative Bewertung vorzunehmen.

Prinzip der lokalen Bewertung

Die Unzufriedenheit mit der Bewertung anhand von Referenzsubstanzen spiegelt sich auch in der Pferdemedizin in verschiedenen Bemühungen wider, ein neues Bewertungsverfahren zu etablieren. So beschreiben bereits 1978 Baker und Quinn ein Verfahren, das die Zunahme der Hautfaltdicke gegenüber dem Zustand vor Injektion als Maßstab heranzieht. Ferroglio et al. (2006) benutzen ein ähnliches Verfahren und bewerten darüber hinaus alle Injektionen als positiv, die nach 24 Stunden noch einen Durchmesser besitzen, der mindestens 1 cm groß ist.

Die hier vorgestellte und biologisch relevantere Bewertung des IKT beruht darauf, die lokale Reaktion an jeder Injektionsstelle selbst zu bewerten (Kinetikverfahren), ohne auf die Kontrollsubstanzen (PBS und Histamin) Bezug zu nehmen. Für diese Bewertungsverfahren sprechen - neben der Heterogenität der Mastzellen - folgende Erkenntnisse: Die Beobachtung verschiedenerer Kinetiken der PBS-Quaddeln, die teilweise auch ohne darin gelöste Testsubstanzen mit einer Durchmesser-Zunahme einhergehen, sind durch die von Injektions- zu Injektionsstelle unterschiedlichen Reizungen der Haut durch den Einstich der Kanüle, den Reiz des eingebrachten Volumens und der von Substanz zu Substanz geringgradig abweichenden pH-Wert Verschiebung verursacht. Die Beobachtungen bei PBS müssen auf alle injizierten Substanzen übertragen werden, da sie hier alle darin gelöst wurden.

Die Kontrollsubstanz Histamin zeigt lokal unterschiedliche Kinetiken, da sowohl die direkten Wirkungen des Histamins unterschiedlich ausgeprägt, als auch die indirekten lokal unterschiedlich reguliert werden können. Der Abbau des Histamins kann zudem lokal aufgrund unterschiedlicher Diaminoxidase-Aktivität variieren.

Folge ist eine potentielle lokale und zeitliche Variabilität der Kinetiken der Kontrollsubstanzen, die sowohl PBS als auch Histamin betrifft. Die Bewertung einer Reaktion auf eine Testsubstanz durch Bezug auf die von Kontrollsubstanzen (als Referenz), ist auf Grund der hier dokumentierten und aus physiologischen Gründen verständlichen Heterogenität der Messwerte fehlerhaft und daher nicht zulässig, will man eine biologisch relevante Reaktionsbewertung des IKT durchführen.

Die lokal unterschiedlichen Kinetiken der gleichen Substanzen in identischer Konzentration erfordern deswegen auch ein

Ablesen der Quaddeln zu verschiedenen Zeiten nach Injektion: Optimal ist eine halbe, eine, zwei, drei, vier und 24 Stunden nach Injektion, da so ein möglichst vollständiges Bild des Reaktionsvermögens einer jeden Injektionsstelle erfasst werden kann.

Diese lokale Bewertung im Kinetikverfahren erfordert einen neuen Bezugspunkt. Dafür eignet sich optimal die Messung des Durchmessers der Ausgangsquaddel an jeder Injektionsstelle (Mikrofläche), solange es sich um eine reine Volumenquaddel handelt. Sie repräsentiert die lokale Situation wie die Positionierung der Einstichkanüle, die Hautdicke, die Straffheit des Bindegewebes und die Verteilung der frisch injizierten Flüssigkeit, jedoch noch keine Reaktion dieser Hautstelle auf die injizierte Flüssigkeit und die darin enthaltene Substanz. Ausgehend von diesem Wert der Ausgangsquaddel zum Zeitpunkt $T=0$ wird jede Größenzunahme des Durchmessers als Ausdruck einer lokalen Reaktion – insbesondere der Mastzellen – auf die injizierte Flüssigkeit und die darin enthaltene Substanz angesehen.

Die Möglichkeit, bereits stattgefunde Reaktionen auf die injizierte Substanz fälschlicherweise einer Volumenquaddel zuzuordnen, lässt sich grundsätzlich durch die jeweils sofortige Messung des Durchmessers nach Injektion ausschließen. Üblicherweise reicht jedoch ein zügiges Ablesen nach Abschluss der Injektion aller Substanzen, wenn dies innerhalb von 3 bis 5 Minuten möglich ist und Histamin als Positivkontrolle zuletzt und unmittelbar vor der Messung injiziert wird. Histamin und das Lösungsmittel werden als positive und negative Kontrolle auch beim Kinetikverfahren mitgeführt. Sie werden jedoch nicht zur Bewertung der Reaktionen auf Testsubstanzen eingesetzt, sondern dienen lediglich als informative Begleitkontrollen.

Da bei IKT-Injektionen – insbesondere bei weniger Erfahrenen – technische Fehler auftreten können, empfiehlt es sich, den Durchmesser einer Ausgangsquaddel als „Qualitätskriterium“ für die i.c. Injektion zu nutzen: Er sollte bei 100 μL injizierter Flüssigkeit mindestens 5 mm betragen, was dem Mittelwert aller gemessenen Testsubstanz-Ausgangsquaddel-Durchmesser minus dreifacher Standardabweichung entspricht. Liegen die Messwerte darunter, sollten diese Injektionen nicht beurteilt, sondern an anderer Stelle wiederholt werden, da sie aller Wahrscheinlichkeit nach eine Fehl-injektionen (zu tief, Luft, Blutung) darstellen.

Herleitung angemessener Grenzwerte („Cut-offs“)

Die Beobachtung, dass auch reine PBS-Quaddeln bis zur dritten Stunde p. inj. eine Zunahme ihres Quaddel-Durchmessers aufweisen können, macht es unmöglich jede Zunahme des Durchmessers einer Testsubstanz gegenüber ihrem Ausgangs-Durchmesser als positive Reaktion im Sinne einer funktionellen Sensibilisierung der Mastzellen anzusehen. Denn diese Zunahme kann allein durch das Lösungsmittel PBS verursacht worden, also unspezifisch sein. Da eine Entscheidung über unspezifische oder spezifische Durchmesser-Zunahmen im Fall einer injizierten Testsubstanz nicht möglich ist, musste ein Grenzwert gefunden werden, der sicher falsch positive Bewertungen ausschließt. Ist die Durchmesser-Zunahme

meiner Testsubstanz (= positiver Delta-Wert) gleich oder größer als der Mittelwert der positiven PBS Delta-Werte plus dreifache Standardabweichung (hier 2,2 mm), kann die Reaktion als fraglich positiv angesehen und mit 0,5 bewertet werden. Ist sie jedoch gleich oder größer als der „PBS-Mittelwert“ plus sechsfache Standardabweichung (hier 3,6 mm), gilt sie als deutlich positive Reaktion und wird mit 1,0 bewertet.

Informationsgehalt des IKT bei Bewertung mit dem Kinetikverfahren

Die gleichzeitige Prüfung einer Testsubstanz in mindestens zwei verschiedenen Konzentrationen an mindestens zwei unterschiedlichen Mikro- und Makroflächen minimiert die Wahrscheinlichkeit, nur schwach positive oder negativ reagierende Lokalisationen getroffen zu haben und so zu einer falsch negativen Bewertung zu kommen.

Ergibt die vollständige Auswertung aller Injektionsflächen einer Testsubstanz in beiden Konzentrationen an mindestens einer Fläche bei mindestens einer Konzentration ein positives Ergebnis (1,0), so ist damit sicher eine funktionelle Sensibilisierung der dermalen Mastzellen nachgewiesen. Sie besagt, dass der positive Proband auf die injizierte Substanz mit einer Typ I Immunreaktion reagieren kann. Ob er auf diese Substanz mit einer so überschießenden Typ I Reaktion reagiert, dass diese klinisch diagnostizierbare Symptome hervorruft, kann aus einer positiven IKT-Reaktion nicht gefolgert werden. Wird die IKT-Reaktion unter den hier beschriebenen Kautelen als negativ bewertet, ist eine funktionelle Sensibilisierung dermalen Mastzellen sehr unwahrscheinlich. Somit dürfte der für eine Substanz als negativ beurteilte Proband mit seinen Mastzellen auf diese Substanz auch nicht Typ I allergisch reagieren können.

Positive IKT-Befunde bedeuten nicht, dass eine Allergie des Probanden auf diese Testsubstanz diagnostiziert wurde. Es wurde lediglich eine funktionelle Reaktionsbereitschaft der Mastzellen dieses Tieres gegen das positiv bewertete Antigen nachgewiesen, so wie in einem positiven FIT-Ergebnis auch nur die funktionelle Reaktionsbereitschaft der Basophilen festgestellt wird. Die Allergie stellt die klinisch zu diagnostizierende Ausprägung einer tatsächlich stattgefundenen überschießenden Typ I Immunreaktion dar.

Die Aussage über eine funktionelle Sensibilisierung im IKT beinhaltet vielmehr die Summe folgender Informationen:

- ausreichender Besatz der Mastzellen mit sensibilisierenden Antikörpern, die überwiegend an aktivierende Fc Rezeptoren gebunden sind und
- funktionell ausreichende Sensibilisierung der Mastzellen, auf eine Substanz mit einer Typ I Reaktion antworten zu können

Die klinische Relevanz dieses Untersuchungsergebnis ergibt sich aus der funktionellen Sensibilisierung der einzelnen dermalen Mastzellen gegenüber einem Antigen (Reaktionsbereitschaft) und kontrollierenden Regulationsmechanismen bei Antigenkontakt, die eine überschießende Reaktion bis hin zu klinischen Symptomen erst zulassen.

Praktische Durchführung

Patienten

Vor Durchführung des IKTs werden die Patienten einer klinischen Allgemeinuntersuchung unterzogen und ein ausführlicher Vorbericht erhoben. Von entscheidender Bedeutung ist, dass dem Patienten in den letzten vier Wochen vor Durchführung des Tests keine Glucocortikoide gegeben wurden. Unruhige Tiere können ggf. mit Detomidin [0,01 mg/kg i. v.] oder einer Kombination von Detomidin [0,01 mg/kg i. v.] und Xylazin [0,5 mg/kg i. v.] sediert werden, ohne dass eine Beeinflussung der Testergebnisse befürchtet werden muss. Um allergisch-anaphylaktische Reaktionen sofort therapieren zu können, sollte Adrenalin oder Epinephrin in gebrauchsfertiger Lösung aufgezogen in einer Spritze sowie Infusionbestecke und Ringer-Laktat-Lösung o. ä. für einen erforderlichen Volumenersatz bereit gehalten werden.

Material

Antigene

Grundsätzlich muss an dieser Stelle noch einmal festgehalten werden, dass sich die Antigenpräparationen von Charge zu Charge deutlich unterscheiden können und ihr genauer Gehalt an antigenen Molekülen oder gar Epitopen bisher nicht standardisiert ist. Abhilfe sollen hier auf längere Sicht rekombinante Antigene schaffen. Die Auswahl der Antigene erfolgt nach ihrer potentiellen Bedeutung für den Patienten. Ggf. nicht verfügbare Antigene können durch kreuzreagierende Antigene ersetzt werden. Zur diagnostischen Anwendung bei Pferden mit oder Verdacht auf Typ I allergisch bedingten Erkrankungen wie Sommereczem, Headshaking oder Bronchitis können Antigenpräparationen eingesetzt werden, wie sie in Tab. 5 dargestellt sind. Es sollten jeweils zwei verschiedene Konzentrationen verwendet werden, da wir teilweise ein Prozonophänomen beobachtet haben. Bei den uns zur Verfügung stehenden Präparationen haben sich Konzentrationen von 5 und 50 µg/mL bewährt, wobei jeweils 0,5 und 5 µg Antigen pro Injektion mit 100 µL injiziert werden. Die Antigenpräparationen werden zweckmäßig in phosphatgepuffeter Kochsalzlösung (= PBS) gelöst. Es sollten nur aufbereitete Präparationen verwendet werden. Dies bedeutet, dass sie von unerwünschten Begleitstoffen wie Histamin und Konservierungsmitteln befreit sowie sterilfiltriert wurden und ihre Antigenkonzentration anschließend bestimmt wurde (mittels Messung der Proteinkonzentration der Präparation). Zudem muss sicher gestellt sein, dass die injizierte Antigenpräparation nicht als Vektor zur Übertragung von Erregern (Bakterien, Viren) dient. Im Zweifelsfalle ist diese Gefahr durch eine Bestrahlung der Antigenpräparation mit 1.000 Gy sicher auszuschließen.

Test- und Kontrollsubstanzen

Testsubstanzen sind die gelösten Antigene, mit deren Injektion geprüft werden soll, ob die Hautmastzellen eines Tieres dagegen so ausreichend sensibilisiert sind, dass durch die Bindung des injizierten Antigens die membranständigen Antikörper überbrückt und dadurch die Zelle zur Freisetzung von Mediatoren veranlasst wird. Als negative Kontrollsubstanzen wird

Tab 5 Antigenpräparationen zur Anwendung bei Pferden mit Verdacht auf eine Typ I allergische Erkrankung wie allergische Dermatitis (z. B. Sommereczem), allergische Bronchitis, allergisches Headshaking. (Diese Präparationen wurden freundlicher Weise von Greer Laboratories, Lenoir, NC 28645, USA zur Verfügung gestellt.) *Soluble antigen preparations which have been used to support diagnosis of type I allergic diseases such as allergic dermatitis (e.g. summer eczema), allergic bronchitis or allergic headshaking. All of these antigens were kindly provided by Greer Labs., Lenoir, NC 28645, USA).*

Antigenlösungen, die im IKT eingesetzt wurden:	
Name der Präparation (deutsch und englisch)	
	Lateinische Bezeichnung
	Bei Mischungen: Zusammensetzung
Insektenantigene	
Bremse (= Horse fly)	Tabanus spp.
Eintagsfliege (= Mayfly)	Ephemeroptera
Feuerameise (= Fire ant)	Solenopsis invicta
Gnitze (= Biting midge)	Culicoides nubeculosus
Motten (= Moth)	Heterocera
Stechmücke (= Mosquito)	Culicidae
Stubenfliege (= Domestic fly)	Musca domestica
Wadenstecher (= Stable fly)	Stomoxys calcitrans
Pflanzliche Antigene	
Baumpollenmischung (= Tree mix)	Acer saccharum (Zuckerahorn) Betula nigra (Schwarzbirke) Carya ovata (Schindelborkige Hickorynuß) Fraxinus americana (Amerikanische Esche) Fagus americana (Amerikanische Buche) Jugulans niger (Schwarze Walnuß) Platanus occidentalis (Platane) Populus deltoides (Schwarzpappel) Quercus rubra (Roteiche) Salix nigra (Schwarzweide) Ulmus americana (Amerikanische Weißulme)
Gräsermischung (= Grass mix)	Agrostis alba (Weißes Straußgras) Anthoxanthum odoratum (Wiesenruchgras) Dactylis glomerata (Gemeines Knäulgras) Festuca elatior (Schwingelgras) Lolium perenne (Deutsches Weidelgras) Phleum pratense (Wiesenlieschgras) Poa pratensis (Wiesenrispengras)
Spätblüher-Mischung (= Late pollen mix)	Amaranthus hybridus (Grünähriger Fuchsschwanz) Artemisia vulgaris (Gemeiner Beifuß) Chenopodium ambrosianum (Mexikanisches Teekraut) Iva ciliata (Weidenröschen) Xanthium commune (Spitzklette)
Pilzantigene	
Pilzmischung (= Mold mix)	Alternaria alternata Aspergillus niger Cladosporium sphaerospermum Bipolaris sorokiniana Penicillium notatum

einerseits das Lösungsmittel (z. B. PBS) injiziert, da es dem Untersucher zur Kontrolle der eigenen Injektionstechnik und zur Abschätzung des Resorptionsvermögens der getesteten Hautfläche dient. Als positive Kontrollsubstanz wird Histamin in einer Konzentration von 100 µg/mL injiziert. Damit kann geprüft werden, ob evtl. Wirkstoffe im Tier vorhanden sind, die Histamin-Rezeptoren blockieren oder ausgeschüttetes Histamin inaktivieren und so falsch negative Resultate - auch auf die Testsubstanzen - vortäuschen.

Spritzen und Kanülen

Wir empfehlen die Verwendung von Tuberkulin-Spritzen mit Spardorn, um Totvolumen in der Spritze zu vermeiden und

eine exakte Applikation der 100 μL zu erzielen. Dazu 27 G x 3/4" Nadeln. Die Identität der aufgezogenen Testsubstanz sollte auf jeder Spritze festgehalten werden, um Verwechslungen zu vermeiden und ein zügiges Injizieren aller Substanzen nacheinander zu gewährleisten. Dazu haben sich Filzstiftmarkierungen auf der Druckplatte des Spritzenstempels bewährt.

Methode

Die Durchführung sollte grundsätzlich in einem trockenen, windgeschützten, gut beleuchteten, ruhigen Bereich erfolgen, idealerweise in einem Behandlungsraum mit gleich bleibenden Bedingungen. Im Protokoll (s. Tab. 6) sollte zumindest die Umgebungstemperatur, aber auch sonstige besondere Gegebenheiten vermerkt werden. IKTs sind bei kalten, insbesondere frostigen Temperaturen zu vermeiden.

Vor Beginn der Arbeit am Patienten müssen die Testsubstanzen gelöst und je 100 μL in separaten Tuberkulin-Spritzen mit aufgesetzter 27 G x 3/4" Nadel aufgenommen werden. Die Patienten werden einer Allgemeinuntersuchung unterzogen und das Ergebnis im Protokoll dokumentiert (s. Tab. 6). Anschließend wird der Testbereich geschoren, rasiert und mit unvergälltem Alkohol desinfiziert. Abschließend werden die Injektionsstellen mit einem Permanentmarker markiert (s. Abb. 9).

Die Testsubstanzen - möglichst auf ca. 20°C temperiert - werden zügig nacheinander streng intrakutan im Abstand von mindestens 5 cm voneinander injiziert, wobei das Lösungsmittel als vorletzte und Histamin als letzte Substanz appliziert werden. Gewisse Antigenpräparationen lösen relativ schnelle Reaktionen aus, wie z. B. Pferdebremse. Diese sollten dann



Abb 9 Vorbereiteter Testbereich (Makrofläche) unmittelbar vor Beginn des IKTs
Skin area (macro area) prepared for IDT



Abb 10 Technik der intrakutanen Injektion
IDT injection technique

unmittelbar vor Histamin injiziert werden. Die Injektion erfolgt unter Bildung einer Hautfalte, in die die Nadel in einem Winkel von ca. 15° - 20° mit dem Anschliff nach oben eingeschoben wird (Abb. 10).

Um eine Injektion in ein Hautgefäß zu vermeiden, wird vor der Injektion ein leichter Unterdruck erzeugt. Tritt keine Flüssigkeit (Blut oder Lymphe) in die Spritze ein, können die 100 μL injiziert werden. Ansonsten wird die Kanüle weiter geschoben, bis eine zuverlässige intrakutane Injektion gewährleistet ist. Die richtige Einstichtiefe wird durch Sichtkontrolle der entstandenen Quaddel überprüft. Quaddeln, deren Durchmesser aufgrund dieser Kontrolle nicht mindestens fünf mm groß sind, werden als Fehl injektionen verworfen und an anderer Stelle wiederholt bzw. nicht ausgewertet. Um reflektorische Hautzuckungen möglichst zu minimieren, verbleibt eine Hand während des Spritzenwechsels permanent in Hautkontakt zur nächsten Injektionsstelle.

Unmittelbar nach der Injektion aller Test- und Kontrollsubstanzen wird der Durchmesser der Ursprungsquaddeln (= Ausgangsquaddel) einer jeden Injektion z. B. mit einer leichtgängigen Schieblehre mit digitaler Maßangabe bestimmt (Messfehler +/- 0,2mm) und ins Protokoll eingetragen. Dieses Vorgehen kann durch geübte Tierärzte praktiziert werden, wenn die Injektion aller Substanzen insgesamt fünf Minuten nicht übersteigt – allerdings müssen stets Histamin oder schnell reagierende Testsubstanzen (z. B. Pferdebremse) unmittelbar nach Injektion abgelesen werden. Weniger erfahrene Tierärzte sollten unmittelbar nach jeder einzelnen Injektion die Größe der Ausgangsquaddel messen.

Bei kreisrunden Quaddeln reicht eine Messung. Hingegen muss bei ovalen oder unregulär auslaufenden Quaddeln der größte und kleinste Durchmesser bestimmt und beide Werte

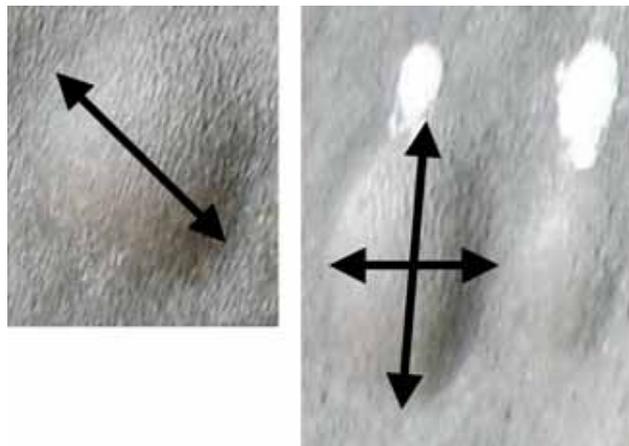


Abb 11 Ablesen runder und ovaler Hautquaddeln im IKT
Measuring the diameter of round and oval skin pustules in IDT

ins Protokoll (s. Tab. 6) eingetragen werden. Anschließend wird ihre Summe halbiert und als Messwert für dies Quaddel in die Bewertung einbezogen. (s. Abb. 11). Zur Erfassung einer Hautreaktion auf die injizierte Substanz wird der Durchmesser an jeder Mikrofläche (= Injektionsstelle mit unmittelbarer Umgebung) eine halbe, eine, zwei, drei, vier und ggf. 24 h nach der Injektion gemessen und in einem Untersuchungsprotokoll (s. Tab. 6) festgehalten.

Tab 6 (linke Seite) Protokoll zur Durchführung eines IKT: Übersichtsblatt und Ergebnisblatt
Protocol for IDT documentation: Master sheet and result sheet

Bewertung nach dem Kinetikverfahren (vgl. Tab. 4)

Bewertungskriterium

Zu jedem Ablesezeitpunkt (zwischen 30 Minuten und 24 h) wird der Durchmesser einer jeden Test-Quaddel gemessen. Die Differenz zur Ausgangs-Quaddel an derselben Mikrofläche wird als Delta-Wert bezeichnet. Nur Durchmesser-Zunahmen (= positive Delta-Werte) werden anschließend in die Bewertung aufgenommen.

Auswertung

(Ein Programm zur Auswertung kann bei den Verfassern kostenlos bezogen werden.)

Bewertung für jeden einzelnen Ablesezeitpunkt

Ein positiver Delta-Wert, der den Grenzwert (Cut off) von 2,2 mm erreicht oder übersteigt, jedoch kleiner als 3,6 mm ist, wird als möglich positive Reaktion angesehen und erhält eine Bewertungszahl von 0,5. Ist der Wert gleich oder größer als 3,6 mm gilt er als deutlich positiv und erhält eine Bewertungszahl von 1,0. Werte, die kleiner als 2,2 mm sind, werden als negative Reaktion angesehen.

Bewertung der Reaktion an der einzelnen Injektionsstelle über die gesamte Zeit

Die Bewertungszahlen aller Einzelablesungen einer Mikrofläche (Injektionsstelle samt unmittelbare Umgebung) werden addiert. Erreicht die Summe der Deltawerte aller Ablesezeitpunkte einen Wert von mindestens 1,0, so gilt die Reaktion auf die injizierte Testsubstanz an dieser Stelle als positiv im Sinne einer antigenspezifischen funktionellen Sensibilisierung der Mastzellen (s. Tab. 4).

Bewertung der Testsubstanz für das Tier

Ein Tier wird bezüglich einer geprüften Testsubstanz als positiv im Sinne einer funktionellen Sensibilisierung bezeichnet, wenn es an mindestens einer Injektionsstelle ein positives Ergebnis ($\geq 1,0$) aufweist.

Bewertung beider Konzentrationen einer Testsubstanz für das Tier

Bewirkt eine Konzentrationsstufe ein positives Ergebnis, so gilt das Tier als einfach positiv. Liegt ein positives Ergebnis für beide Konzentrationsstufen vor, so bezeichnen wir das Tier als zweifach positiv. In der Regel handelt es sich in dem Fall einer einfachen Positivität um die hohe Konzentration, die ein positives Ergebnis bewirkt. In Ausnahmefällen kann dies jedoch auch die niedrigere Konzentration sein. Auch dann bezeichnen wir das Tier als einfach positiv.

Abkürzungsverzeichnis und Begriffserklärungen

FIT: Funktioneller in vitro Test zum Nachweis Typ I allergischer Effektorzellen; IKT: Intrakutantest; Kinetikverfahren: die Hautreaktion auf eine Testsubstanz wird ausschließlich an der einzelnen Injektionsstelle im Zeitverlauf bewertet. Dabei

dient die Größe der allein durch das Injektionsvolumen bedingte „Ausgangsquaddel“ als Bezugspunkt für die zeitabhängige Quaddelentwicklung als Ausdruck einer Hautreaktion auf die Testsubstanz („Reaktionsquaddel“); Makrofläche: zusammenhängende Hautfläche, an der mehrere intrakutane Injektionen platziert werden; Mikrofläche: Hautbereich an und unmittelbar um eine intrakutane Injektionsstelle; PBS: Phosphat gepufferte Kochsalzlösung, p. inj. (post injectionem); Referenzverfahren: die Hautreaktion auf eine Testsubstanz an einer Injektionsstelle wird in Abhängigkeit von der einer positiven Kontroll- oder Referenzsubstanz (Histamin) plus der einer negativen Kontroll- oder Referenzsubstanz (nur Lösungsmittel) an jeweils anderen Injektionsstellen bewertet.

List of abbreviations and glossary

FIT: Functional in vitro test for sensitized type I allergic effector cells; IDT: Intradermal test; Kinetic assessment: A skin reaction to an injected test substance is solely assessed at its own micro area. At each micro area the “initial pustule” caused exclusively by the injected liquid volume is used as the reference value for the time dependent development of the “reaction pustule” due to skin reactivity to the injected substance; Macro area: A larger skin area to perform several IDT injections; Micro area: Injection site plus proximate surrounding; PBS: Phosphate buffered saline, p. inj. (post injectionem); Reference assessment: A skin reaction to an injected test substance at one micro area is assessed only in comparison to a positive (usually histamine) plus a negative (usually the solvent) reference substance at other micro areas.

Literatur

- Alexander H. L. (1931) An evaluation of the skin test in allergy. *Ann. Inter. Med.*, 5, 32 zit. nach Norman et al. (1973)
- Anderson G. S., Belton P. und Kleider N. (1991) *Culicoides* obsoletus (Diptera: Ceratopogonidae) as a Causal Agent of *Culicoides* Hypersensitivity (Sweet itch) in British Columbia. *J. Med. Entomol.* 28, 685-693
- Baker K. P. und Quinn P. J. (1978) A report on clinical aspects and histopathology of sweet itch. *Equine Vet. J.* 10, 243-248
- Baselgia B., Doherr M. G., Mellor P., Torsteinsdottir S., Jermann T., Zurbriggen A., Jungi T. und Marti E. (2006) Evaluation of an in vitro sulpholeukotriene release test for diagnosis of insect bite hypersensitivity in horses. *Equine Vet. J.* 38, 40-46
- Church M. K., Holgate S. T., Shute J. K., Walls A. F. und Sampson A. P. (1998) Mast cell-derived mediators. in: E. Middleton jr., C. E. Reed, E. F. Ellis et al (Eds.): *Allergy, principles & practice*. 5th ed., Mosby, Philadelphia, Vol 1, 146-167
- Dreborg S. (1989) Skin tests used in type I allergy testing (Position paper). *Allergy Supp.* 10, 44, 1-59
- Fadok V. A. und Greiner E. C. (1990) Equine insect hypersensitivity: skin test and biopsy results correlated with clinical data. *Equine Vet. J.* 22, 236-240
- Ferroglio E., Pregel P., Accossato A., Taricco I., Bolio E., Rossi L. und Trisciuglio A. (2006) Equine *Culicoides* Hypersensitivity: Evaluation of a Skin Test and of Humoral Response. *J. Vet. Med. A*, 53, 30-33
- Galli S. J., Nakae S. und Tsai M. (2005) Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nature immunology*, 6, 135-142

- Jose-Cunilleras E., Kohn C. W., Hillier A., Saville W. J. A. und Lorch G. (2001) Intradermal testing in healthy horses and horses with chronic obstructive pulmonary disease, recurrent urticaria, or allergic dermatitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 219, 1115-1121
- Kaul S. (1998) Typ I Allergien beim Pferd: Prinzipielle Entwicklung eines funktionellen in vitro Nachweises. *Vet. Med. Diss. Hannover*
- Lebis C., Bourdeau P. und Marzin-Keller F. (2002) Intradermal skin tests in equine dermatology: a study of 83 horses. *Equine Vet. J.* 34, 666-672
- Lorch G., Hillier A., Kwochka K. W., Saville W. J., Kohn C. W. und Le Roy B. E. (2001) Comparison of immediate intradermal test reactivity with serum IgE quantitation by use of a radioallergosorbent test and two ELISA in horses with and without atopy. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 218, 1314-1322
- Marshall J. S. (2004) Mast-cell responses to pathogens. *Nature reviews Immunology*, 4, 787-799
- Norman P. S., Lichtenstein M. und Ishizaka K. (1973) Diagnostic tests in ragweed hay fever. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 52, 210-224
- Reedy L. M., Miller W. H. und Willemse T. (2002) Allergische Hauterkrankungen bei Hund und Katze. 1. dt. Aufl., Schlütersche, Hannover
- Rees C. A. (2001) Response to immunotherapy in six related horses with urticaria secondary to atopy. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 218, 753-755
- Schatzmann U. und Gerber H. (1972) Untersuchungen zur Ätiologie chronischer Lungenerkrankungen des Pferdes. *Zbl. Vet. Med. A*, 19, 89-101
- Walzer M. (1936) Immunology. A critical review of some recent developments in the field of allergy. *J. Allergy* 7, 597 zit. nach Norman et al. (1973)
- Wong D. M. (2003) The intradermal Skin Test in the Horse: Value as a Diagnostic Modality in Equine Medicine. Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, Thesis for the degree of Masters of Science
- Wong D. M., Buechner-Maxwell V. A. und Manning T. O. (2005a) Equine Skin: Structure, Immunologic Function and Methods of Diagnosing Disease. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.*, 463-472
- Wong D. M., Buechner-Maxwell V. A., Manning T. O. und Ward D. L. (2005b) Evaluation of the precision of intradermal injection of control substances for intradermal testing in clinically normal horses. *Am. J. Vet. Res.* 66, 1341-1347
- Wong D. M., Buechner-Maxwell V. A., Manning T. O. und Ward D. L. (2005c) Comparison of results for intradermal testing between clinically normal horses and horses affected with recurrent airway obstruction. *Am. J. Vet. Res.* 66, 1348-1355

Dr. med. vet. Stefan Hampel, VetStOffz
Einsatz- und Ausbildungszentrum für Gebirgstragtierwesen 230
Artilleriekaserne
Nonner Str. 25
83435 Bad Reichenhall
wldoma@hotmail.com