

In vitro-Allergietests beim Sommerexzem des Pferdes – Zusammenhang zur klinischen Ausprägung, Zuverlässigkeit in der insektenfreien Zeit und möglicher Einfluss einer parasitären Belastung

Heidrun Gehlen und Magdalena Brunner

Klinik für Pferde, Allgemeine Chirurgie und Radiologie der Freien Universität Berlin

Zusammenfassung: In der vorliegenden Arbeit wurden die in-vitro Allergietests „Funktioneller In-vitro Test“ (FIT) und der „Cellular Antigen Stimulation Test“ (CAST) bzw. „Basophilen-Degranulations-Test“ (BDT) bei Pferden mit Sommerexzem zeitgleich durchgeführt und die Testergebnisse mit der Ausprägung des Sommerexzems (anhand eines klinischen Scores) verglichen. Es sollte geprüft werden, auf welche Insektenallergene die Pferde reagieren, wie stark die allergische Reaktionsbereitschaft der Pferde ist und inwieweit die Tests auch in der insektenfreien Zeit zuverlässige Ergebnisse liefert. Zudem wurde überprüft ob und inwieweit eine zusätzliche Verwurmung einen Einfluss auf die in-Vitro Testergebnisse hatte. Dazu wurden 51 Pferde mit Sommerexzem in der insektenfreien Zeit (Februar) mit dem FIT auf acht verschiedene Insekten (Gnitze, Wadenstecher, Kriebelmücke, Eintagsfliege, Motte, Stechmücke, Pferdebremse, Hausfliege) und mit dem CAST/BDT auf 4 verschiedene Insekten (Gnitze, Bremse, Kriebelmücke, Stechmücke) getestet. Die Einteilung der Stärke der Reaktion im FIT erfolgte von 0 (= keine Reaktion) bis 4 (= hgr. Reaktion). Beim CAST wurde der Schwellenwert einer positiven Reaktion auf 250 pg/ml Gesamtgehalt aller freigesetzten Sulfidoleukotriene und seiner Metaboliten festgelegt. Zudem wurden die klinische Ausprägung des Sommerexzems im Vorjahr und das Entwurmungsmanagement anhand eines Besitzerfragebogens eruiert. Alle Pferde wurden außerdem zeitgleich zu den in-vitro Tests klinisch-dermatologisch untersucht und mit einem klinischen Sommerexzem-Score bewertet. Bei allen Pferden wurden des weiteren Kotproben für parasitologische Untersuchungen gewonnen. Der Vergleich der beiden Allergietests zeigte, dass beide Tests auch in der insektenfreien Zeit repräsentative und annähernd vergleichbare Ergebnisse in Bezug auf die Erkrankung Sommerexzem liefern. Zwei Pferde zeigten im FIT trotz deutlicher klinischer Ausprägung keine Reaktionsbereitschaft auf die acht getesteten Insekten. Drei der eingeschickten Blutproben wurden vom Labor als nicht auswertbar eingestuft. Mit 81,3% reagierten die meisten Tiere auf die Motte, ein nicht blutsaugendes und somit nicht Sommerexzem relevantes Insekt. Erst an zweiter Stelle fand sich die Gnitze mit 72,9% gefolgt von der Stechmücke mit 62,5%. Fast 60% der Tiere zeigten beim FIT eine allergische Reaktionsbereitschaft auf die ebenfalls nicht Sommerexzem relevante Eintagsfliege. Sieben Pferde reagierten auf alle acht getesteten Insekten. Beim Vergleich des klinischen Scores mit den Ergebnissen des FIT zeigte sich keine signifikante Korrelation. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass auch die im FIT getesteten, primär nicht am Sommerexzem-Komplex beteiligten Insekten mit ihren kreuzreagierenden Allergenen möglicherweise eine zusätzliche immunologische Rolle bei den betroffenen Pferden spielen. Inwieweit diese Kreuzreaktivitäten das Testergebnis bzw. die Testsicherheit des FIT beeinflussen bleibt spekulativ. Beim CAST waren zwei der eingeschickten Proben aufgrund labortechnischer Probleme nicht auswertbar. Sieben Pferde (14,2%) zeigten bei allen getesteten Insekten keine Reaktionsbereitschaft über den vom Labor als Schwellenwert angegebenen 250 pg/ml. Die meisten Pferde reagierten mit 71,4% auf die Gnitze (35/49), gefolgt von der Stechmücke mit 61,2% (30/49), der Kriebelmücke mit 21 Pferden (42,9%) und schließlich der Bremse (19/49; 38,8%). Bei den Kotuntersuchungen zeigten 59% der Pferde eine Verwurmung, wobei mit 85% die Pferde am häufigsten mit Strongyloiden befallen waren. Beim Vergleich des Grades der Verwurmung und der klinischen Ausprägung des Sommerexzems der Pferde (Sommerexzemscore) konnte keine statistisch signifikante Korrelation festgestellt werden. Bei der Gegenüberstellung der Ausprägung der Verwurmung und der Höhe der allergischen Reaktionsbereitschaft im FIT zeigte sich jedoch eine signifikante Korrelation. Stark verwurmte Tiere hatten einen signifikant niedrigeren FIT ($p = 0,0324$) als leicht bzw. nicht verwurmte Pferde. Ein falsch positives Ergebnis des Allergietests, ausgelöst durch eine starke Verwurmung, scheint deshalb eher unwahrscheinlich

Schlüsselwörter: Sommerexzem, Allergietest, FIT, Verwurmung, Pferd, Dermatologie

In-vitro allergy tests for diagnostic of summer eczema in the horse – Correlation of allergic hypersensitivity in functional in vitro test (FIT) and clinical manifestation under the influence of parasitic burdens

In the presented study, the in-vitro allergy test “functional in-vitro test” (FIT) and the “cellular antigen stimulation test or “basophile degranulation test” (CAST/BDT) were performed in horses suffering from summer eczema and test results were compared to clinical manifestation using a clinical scoring system. We aimed to identify involved insect allergens, evaluate the severity of hypersensitivity and if the tests were reliable in insect-free seasons. In addition, we were interested in the influence of a parasitic burden on the tests results. 51 horses known to be affected by summer eczema were tested during winter using the FIT on 8 insects (biting mites, biting housefly, blackfly, mayfly, moth, gnat, horsefly, housefly) and 4 insects with the CAST/BDT (biting mites, gnats, black fly, horse fly). Classification of severity in the FIT was from 0 (= no reaction) to 4 (= severe reaction). With the CAST a positive reaction above 250 pg/ml sulfidoleucotriene were judged as positive reaction. Owners were also asked with a questionnaire about the clinical signs in the year before and the antiparasitic management. All horses were examined clinically with an eczema-score and feces samples were taken. We found both tests reliable even in the insect-free season for summer eczema. Only 2 horses with clinical signs were tested negative for all 8 insect allergens in the FIT. 3 blood samples could not be analyzed by the laboratory. With 81.3% most horses reacted to moth, followed by 79.2% reacting to biting mites and 62.5% to gnats. Almost 60% of horses showed allergic hypersensitivity in the FIT to houseflies, which are irrelevant for summer eczema. 7 horses reacted to all insect allergens tested. The results allow the suspicion that insect allergens tested in the FIT maybe cross-react. No correlation was found between the clinical scores and the results of the FIT. In the CAST 2 blood samples could not be analyzed by the laboratory. 7 horses with clinical signs were tested negative for all 4 insect allergens in the CAST. With 71.4% most horses reacted to biting mites, followed by 61.2% reacting to gnats, 43% react to blackfly and 39% to horse fly. In fecal samples 59% of horses showed a parasitic burden with 85% positive for strongyles, but there was no correlation between parasitic burden and clinical scores. But the severity of the parasitic

burden and the severity of hypersensitivity in the FIT correlates significantly. Horses with a severe parasitic burden showed significantly lower FIT results ($P=0.0324$) compared to those with a mild or no parasitic infection. Therefore, false-positive results of the allergy test due to a high parasitic burden do not seem likely.

Keywords: summer eczema, allergy test, FIT, CAST, parasitic burden

Zitation: Gehlen H., Brunner M. (2016) Funktioneller In vitro-Test (FIT) beim Sommerekzem des Pferdes: Zusammenhang zur klinischen Ausprägung, Zuverlässigkeit in der insektenfreien Zeit und möglicher Einfluss einer parasitären Belastung. *Pferdeheilkunde* 32, 296-305

Korrespondenz: Prof. Heidrun Gehlen, Freie Universität, Klinik für Pferde, Oertzenweg 19b, 14163 Berlin; E-Mail: heidrun.gehlen@fu-berlin.de

Einleitung

Zur korrekten Diagnosestellung des Sommerekzems (SE) stehen neben dem klinischen Erscheinungsbild verschiedene Allergietests zur Verfügung. Dazu gehören der Intrakutantests (Quinn et al. 1983, Halldorsdottir 1989, Kolm-Stark und Wagner 2002, Lebis et al. 2002), die Bestimmung des IgE-Spiegels (Ungar-Waron et al. 1990, Wilson et al. 2001 und 2006, Wagner et al. 2003), der Histamine-Release-Test (HRT bzw. FIT = Funktioneller In vitro-Test) und der CAST (Cellular Antigen Stimulation Test) bzw. der BDT (Basophilen Degranulations Test; Kaul 1998, De Weck und Sanz 2004, Baselgia et al. 2006).

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die In vitro-Allergietests FIT+CAST hinsichtlich ihrer Zuverlässigkeit in der Diagnostik des Sommerekzems in der insektenfreien Zeit zu überprüfen. Dass es sich beim Sommerekzem um eine allergische Reaktion auf Stiche bestimmter blutsaugender Insekten handelt, wurde bereits 1954 von Rieck aufgrund von Untersuchungen in Australien geschlossen. Heute gilt es als gesichert, dass insbesondere *Culicoides* spp. (Gnizen) weltweit als die bevorzugten Auslöser anzusehen sind (Baker und Quinn 1978, Braverman 1983, Quinn et al. 1983, Anderson 1991/1996, Kurotaki 1994, Wilson et al. 2001 und 2006, Wagner et al. 2006, Lagner et al. 2008 und 2009, Shrestha et al. 2015). *Culicoides* spp. (Diptera, Familie: Ceratopogonidae) sind zwischen 0,5 und 3 mm große Mücken, die nahezu weltweit vorkommen und deren Gattung ca. 800 Spezies umfasst. Auch anderen Insektenarten wie z.B. *Stomoxys calcitrans* und *Simulium* spp. werden eine gewisse Bedeutung für das SE zugesprochen (Heck 1991).

Diagnostische Testverfahren für das Sommerekzem

In vivo-Tests

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

umstritten. Quinn et al. (1983) untersuchten Pferde mit und ohne Sommerekzem (SE) auf ihre Reaktion im Intrakutantest, in dem sie Extrakte von *Culicoides*, *Stomoxys*, *Tabanidae* und *Culex*-Arten einsetzten. Es zeigte sich, dass zwar alle erkrankten Pferde sehr stark auf den *Culicoides*-Extrakt reagierten, jedoch auch drei der sechs gesunden Tiere. Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen Halldorsdottir et al. (1989), wobei die Reaktionen auch von der Konzentration des injizierten Antigens abhingen. Während bei den niedrigeren Konzentrationen eine Reaktion sowohl bei gesunden Pferden als auch bei Pferden mit SE überwiegend negativ bzw. auch falsch positiv ausfiel, reagierte bei höheren Konzentration eine große Anzahl von gesunden und kranken Pferden positiv. Diese Divergenz zwischen den Ergebnissen des Intrakutantests und den klinischen Befunden, falsch positive und negative Ergebnisse, positive Ergebnisse bei Negativkontrollen und eine mäßige Wiederholbarkeit der Testergebnisse bestätigten Lebis et al. (2002). Morris und Lindborg (2003) untersuchten die Bedeutung der Antigenkonzentration für eine zuverlässige Diagnose des Sommerekzems und empfahlen für *C. nubeculosus* eine Konzentration von 1:10.000 beim Einsatz im Intrakutantest. Sie ermittelten für neun von 13 untersuchten verschiedenen Allergenextrakten „irritierende“ Konzentrationen, bei denen Reaktionen auch bei gesunden Pferden hervorgerufen werden konnten. Ein anderes Testverfahren praktizierten Ferroglio et al. (2006). Sie injizierten gesunden und kranken Tieren 0,1 ml eines sterilen *Culicoides*-Extraktes in der Konzentration von 25 µg/l. Eine Schwellung von mindestens 1 cm bei gleichzeitiger Verdickung der Haut um >10% nach 24 Stunden ist laut den Autoren als aussagekräftiger Grenzwert zwischen dem positiven Befund SE und einem entsprechenden negativen Ergebnis anzusehen. Sie benannten eine Sensitivität und Spezifität des Intrakutantestes von 100%, selbst bei einer Durchführung im Winter bei symptomfreien Pferden.

In vitro-Tests

In vitro-Tests haben, im Gegensatz zu In vivo-Tests, den großen Vorteil, dass sie nicht zu einer Allergisierung des Patienten führen. Mögliche Untersuchungsmethoden sind dabei die Messung des Serum-IgE-Spiegels mittels ELISA und zum anderen funktionelle Tests, welche die Allergiebereitschaft auf der Ebene der Effektorzellen ermitteln. Hierbei wird die Freisetzung präformierter (Histamin) und neu synthetisierter (Sulphidoleukotrienen (sLT)) Mediatoren durch die mit einem Allergen aktivierten basophilen Granulozyten geprüft.

Nachweis von IgE

Erst in den letzten Jahren ist es gelungen, monoklonale anti-equine IgE-Antikörper herzustellen, wodurch der spezifische Nachweis von equinem Serum-IgE immunhistologisch, mittels

Westernblot oder ELISA erst möglich wurde. Die Aussagekraft der Bestimmung des Serum-IgE-Spiegels für die Diagnostik von Typ I-Allergien wird in der Humanmedizin jedoch zunehmend als nicht ausreichend angesehen. Als Gründe hierfür gelten der teilweise fehlende Nachweis allergenspezifischen IgEs trotz ausgeprägter allergischer Symptome, die häufig fehlende Korrelation zwischen dem Ausprägungsgrad der klinischen Symptomatik und der Höhe des IgE-Spiegels, die Abhängigkeit des Serum-IgE-Spiegels von der Intensität der Allergenexposition und die Tatsache, dass auch bei Individuen ohne allergische Symptome eine stark variierende IgE-Konzentration im Serum vorhanden sein kann (Gehlhar et al. 1999, Mimura et al. 2004). Inwieweit diese Erkenntnisse vom Menschen auf das Pferd übertragen werden können, ist noch nicht geklärt. Es gibt jedoch Hinweise, dass auch die Bestimmung der equinen IgE-Serumspiegel nicht für eine zuverlässige Diagnostik des Sommerekzems und anderer allergischer Erkrankungen geeignet sind (Ungar-Waron et al. 1990, Wagner et al. 2003, Wilson et al. 2001 und 2006).

Funktioneller In vitro-Test (FIT)

Der Funktionelle In vitro-Test (FIT) gehört zu den Histamine-Release-Tests (HRT). Diese messen Histamin, welches durch verschiedene Allergen-Provokationen in gewaschnem Vollblut freigesetzt wird. Histamin ist der einzige Mediator, der nur von basophilen Granulozyten kurzfristig, d.h. während einer einstündigen Inkubation mit Antigenen, freigesetzt wird. Damit ist der FIT in der Lage, ausschließlich nur die funktionelle Sensibilisierung der Effektorzellen (des Blutes) der Typ I-Allergie zu bestimmen, ohne unspezifische Mediatoren zu messen, die unabhängig von einer allergischen Reaktion von verschiedenen Zellen bei Antigen-Kontakt bzw. aufgrund der Manipulation der in-vitro Untersuchung freigesetzt werden. Anhand des von Kaul (1998) entwickelten Funktionellen in-vitro Testes für das Pferd (FIT) gelang es, eine spezifische Histaminausschüttung basophiler Granulozyten auf eine Stimulation mit *Culicoides nubeculosus* in Blutproben von Sommerekzem-positiven Pferden nachzuweisen. Blutproben von Pferden ohne Sommerekzem reagierten jedoch teilweise auch positiv im FIT-Test. Kobelt (2001) wies zudem nach, dass die spezifische Sensibilisierung basophiler Granulozyten gegen *Culicoides* auch im Winter, außerhalb der klinischen Periode, erhalten bleibt, was insbesondere unter forensischen Aspekten (z.B. im Rahmen der Kaufuntersuchung) von Bedeutung ist. Der FIT-Test wird ausschließlich vom Institut für Immunologie der Tierärztlichen Hochschule in Hannover angeboten. Der Test beruht auf dem Prinzip, dass die basophilen Granulozyten mit den vermuteten Allergenen in verschiedenen Konzentrationen in Kontakt gebracht werden. Sind auf der Oberfläche der Zellen genügend sensibilisierende Antikörper gebunden, werden mehrere benachbarte, an Fc-Rezeptoren gebundene allergenspezifische Antikörper vernetzt und nachfolgend präformierte und neu synthetisierte Mediatoren (Histamin, sLT) freigesetzt. Das freigesetzte Histamin wird in einem RIA (radio immuno assay) quantifiziert und so als Maß für den Grad der Sensibilisierung der basophilen Granulozyten gewertet: Die durch Allergene freigesetzte Histaminmenge wird mit der ins Verhältnis gesetzt, welche durch die physikalische Freisetzung (Zellen werden durch Kochen zerstört) oder durch die eines geeigneten Antikörpers freigesetzt wird (maximale Freisetzung). Die Höhe dieses Verhältnisses entscheidet darüber, ob ein Pferd in Bezug auf das getestete Allergen als

sensibilisiert anzusehen ist (Kaul 1998). Es werden die Hypersensibilisierungsreaktion gegenüber Gnitze (*Culicoides*), Wadentecher (*Stomoxys*), Kriebelmücke (*Simulium*), Eintagsfliege (*Ephemeridae*), Stechmücke (*Culex*), Pferdebremse (*Tabanidae*), Motte und Hausfliege (*Musca Domestica*) getestet.

Cellular Antigen Stimulation Test (CAST)

Im CAST werden aus dem peripheren Blut eines Probanden isolierte Leukozyten zunächst wie beim FIT mit einem entsprechenden Allergenextrakt inkubiert. Dabei wird jedoch hier ihre Bereitschaft getestet, Entzündungsmediatoren, hier Sulphidoleukotriene, neu zu synthetisieren und freizusetzen. Die von den basophilen Granulozyten gebildeten Leukotriene (LT) C4 werden schnell zu LTD4 und LTE4 metabolisiert und der Gesamtgehalt aller freigesetzten sLT und seiner Metaboliten im Anschluss an die Inkubation mit Hilfe eines ELISA bestimmt. Der CAST wurde als alternativer zellulärer Test zum HRT in den Jahren 1989–1993 entwickelt und war von 1993–2010 in Deutschland als Equine CAST kommerziell erhältlich (Bühlmann Laboratories, Allschwil, Schweiz). Zur Zeit wird der Test als CAST oder BDT (Basophilen-Degranulations-Test) von einigen Laboren in Deutschland (Institut für Veterinärmedizinische Diagnostik, Berlin), Österreich (Laboklin) und der Schweiz (Institut für Immunologie, Vetsuisse Fakultät in Bern, Janda et al. 2015) angeboten.

Ein großer Vorteil gegenüber den bis dahin verwendeten RIAs und ELISAs mit ihrer hohen Spezifität für nur eine Form der sLT besteht darin, dass der im CAST angewandte monoklonale Antikörper in der Lage ist LTC4, LTD4 und LTE4 mit gleicher Sensitivität und Spezifität zu messen und so entzündliche Aktivitäten in-vitro besser zu erfassen (De Weck et al. 1993). Weitere Vorteile des Tests liegen in der Tatsache, dass sLT nur von intakten Zellen produziert wird, so dass es nicht zu falsch positiven Ergebnissen durch zytotoxische Aktivitäten kommen kann. Da im Blut von Pferden genügend zirkulierende basophile Granulozyten vorhanden sind, kann der in der Humanmedizin entwickelte Test auch zur Diagnose equiner allergischer Reaktionen herangezogen werden (De Weck 1993). Baselgia et al. (2006) prüften die Eignung des CAST zur Diagnose des überwiegend durch *Culicoides* spp. ausgelösten, IgE-vermittelten SE beim Pferd. Mit Extrakten von *Culicoides nubeculosus* und *Simulium vittatum* untersuchten sie 314 erwachsene Pferde mit und ohne SE. Bei den Pferden mit SE war die sLT-Freisetzung signifikant höher als bei den Pferden ohne SE. Das Ausmaß der klinischen Symptome sowie das Alter der untersuchten Pferde hatten keinen Einfluss auf die Ergebnisse im CAST. Die höchste diagnostische Sensitivität und Spezifität des Testes lag beim Einsatz von *C. nubeculosus*-Extrakten bei 78% bzw. 97%. Einige Pferde reagierten neben den *Culicoides*-Extrakten auch auf die *Simulium*-Präparationen. Insgesamt gesehen hat sich somit der CAST aufgrund seiner hohen Spezifität und guten Sensitivität als brauchbarer Test zur Diagnostizierung allergischer Zustände wie des SEs bei Pferden erwiesen, selbst im Winter bei betroffenen, jedoch symptomfreien Probanden.

Material und Methode

An der Studie nahmen 51 an Sommerekzem erkrankte Pferde teil, die seit mindestens einem Jahr entsprechende klinische

Symptome zeigten. Dies wurde über einen speziellen Besitzerfragebogen verifiziert.

Die Gruppe der Studienpferde setzte sich aus 30 Wallachen, 16 Stuten und fünf Hengsten zusammen. Das Durchschnittsalter der Pferde betrug $10 \pm 6,1$ Jahre, wobei das jüngste Pferd zwei, das älteste Pferd 31 Jahre alt war. Das Durchschnittsgewicht lag bei $491 \text{ kg} \pm 156 \text{ kg}$. Die Untersuchung fand im Februar statt und umfasste eine Allgemeinuntersuchung der Pferde, eine spezielle Untersuchung der Haut und eine Anamnese mit ausführlicher Besitzerbefragung zur Ausprägung des Sommerkezems im Vorjahr sowie eine Blutprobenentnahme für die Durchführung der speziellen Allergietests (FIT+CAST) und eine parasitologische Kotprobenuntersuchung.

Klinische Allgemeinuntersuchung und dermatologische Untersuchung

Bei allen Pferden wurde eine Allgemeinuntersuchung durchgeführt, um den aktuellen Gesundheitsstatus der Pferde zu ermitteln. Die Beurteilung der Haut wurde mit einem Sommerkezem-Score-System durchgeführt. Anhand der Ergebnisse wurde die klinische Ausprägung des Sommerkezems beurteilt. Dazu wurden die 12 häufigsten Sommerkezemstellen (Kopf, Schopf, Hals 1/3, Hals 2/3, Hals 3/3, Brustwirbelsäule, Vorderbrust, Lendenwirbelsäule/Kruppe, Hinterhand kaudal, Schweif, Bauchnaht, Schenkelspalt Hinterextremitäten) mit den fünf wichtigsten Symptomen (Haarbruch, Alopezie, blutige/eitrige Hautveränderungen, Hautverdickung, Schuppen) in Verbindung gesetzt. Für jede Stelle und jedes Symptom wurde der Schweregrad von 0 = keine Symptome, 1 = geringgradige Symptome, 3 = mittelgradige Symptome, 4 = hochgradige Symptome, 5 = höchstgradige Symptome angegeben und die Punktzahlen anschließend addiert. Daraus ergab sich eine maximale Punktzahl von 300 Punkten pro Pferd (12 Regionen \times 5 Symptome \times 5 Schweregrade).

Besitzerfragebogen

Die Besitzer der Pferde wurden ausführlich zur klinischen Ausprägung des Sommerkezemes (Juckreiz, haarlose Stellen, Haarbruch usw.) ihrer Pferde im Vorjahr und zum Entwurmungsregime befragt.

Funktioneller In vitro-Test (FIT)

Für den FIT-Test wurden jedem Pferd 20 ml venöses EDTA-Blut entnommen und per Overnight-Express (TNT Express) am sel-

ben Tag an das Institut für Immunologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover geschickt, wo es umgehend bearbeitet wurde. Im Labor wurde das Blut auf eine mögliche allergische Reaktionsbereitschaft auf folgende Insektenallergene untersucht: Gnitze, Wadenstecher, Kriebelmücke, Eintagsfliege, Motte, Stechmücke, Pferdebremse und Hausfliege. Die Einteilung der Schweregrade des FIT erfolgte von 0 (= keine Reaktion) bis 4 (= hgr. Reaktion). Ergebnisse von 0,5 galten als fraglich positiv. Da acht Insektenallergene getestet wurden ergab sich daraus eine maximale Punktzahl von 32 Punkten je Pferd, welche man durch Multiplikation erhielt (4 Reaktionsstufen \times 8 Insekten = 32 Punkte).

CAST

Für den CAST wurden ebenfalls 20 ml venöses Blut in den vom Labor zur Verfügung gestellten „ACD-B Vacuetten“ am Tag der Blutentnahme per laboreigenem Kurier ins Labor geschickt und dort ausgewertet. Hier wurde die Reaktionsbereitschaft der vier Insekten Gnitze, Bremse, Kriebelmücke und Stechmücke getestet. Werte über 250 pg/ml (Gesamtgehalt aller freigesetzten Sulfidoleukotriene und ihrer Metaboliten) galten als Schwellenwert für eine positive Reaktionsbereitschaft.

Kotuntersuchung

Bei den Pferden wurden zusätzlich Kotproben gesammelt um einen eventuellen Zusammenhang zwischen den Ergebnisse des Allergietests und dem klinischen Score mit den Ergebnissen der Kotproben zu überprüfen. Aufgrund der Haltung (Offenstall) oder fehlender Kooperation der Pferde war es lediglich bei 34 Pferden möglich, eine dem Patienten sicher zuzuordnende Kotprobe zu gewinnen. Die Kotproben wurden gekühlt an den Lehrstuhl für vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie der LMU München geschickt. Dort wurden sie mit der kombinierten Flotation/Sedimentationsmethode, der McMaster-Methode und dem Auswanderverfahren untersucht. Die Ergebnisse wurden schließlich den Ergebnissen der Allergietests und dem klinischen Score gegenübergestellt.

Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel Version 2000 sowie dem statistischen Programmpaket SPSS für Windows Version 15.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Für den Vergleich des Tests mit der klinischen Ausprägung (Score) wurde die Korrelation nach Spearman verwendet. Für den Vergleich der Allergietests wurde der Chi2-Test verwendet Die

Tab. 1 Ausprägung des SE im Vorjahr (Besitzerfragebogen) | *Severity of insect hypersensitivity the year before (owners' questionnaire).*

Ausprägung (%)	Keine	Geringgradig	Mittelgradig	Hochgradig
Juckreiz	0	0	18	82
Haarlose Stellen	10	18	41	31
Schuppen	18	18	51	14
Blutige Krusten	24	14	39	24
Hautverdickung	24	22	31	24
Schmerzen	41	14	27	18

Gegenüberstellung der Ergebnisse der Allergietests und der Ergebnis der Kotproben wurde mittels FISHER-Exact-Test durchgeführt. Für die Interpretation der resultierenden p-Werte wurde ein lokales Signifikanzniveau von 5% ($p \leq 0,05$) festgelegt.

Ergebnisse

Besitzerfragebogen

Die Ausprägung des Sommerekzems bzw. den Schweregrad der Erkrankung bei ihren Pferden beurteilten die Besitzer vor Beginn der Studie wie folgt: 12% fanden die Ausprägung bei ihrem Pferd geringgradig, 45% stufen den Zustand als mittelgradig und 43% als hochgradig ein. Alle Pferde zeigten laut Besitzer Juckreiz. Dieser wurde von ihnen auch als schwerwiegendstes und häufigstes Symptom eingeschätzt. Die weiteren Ausprägungen des Ekzems, beurteilt durch die Pferdebesitzer, sind Tabelle 1 zu entnehmen. Die stärkste Ausprägung der Symptome war bei 40% der Pferde im Frühjahr, 70% der Tiere zeigten die deutlichsten Symptome im Sommer und 55% der Pferde im Herbst. Aufgrund von jahreszeitlich übergreifender Ausprägung bei einigen Pferden wurden Mehrfachnennungen berücksichtigt.



Abb. 1 Starker Haarbruch und Alopecie am Mähnenkamm | Severe hair breakage and alopecia at the crestfallen.

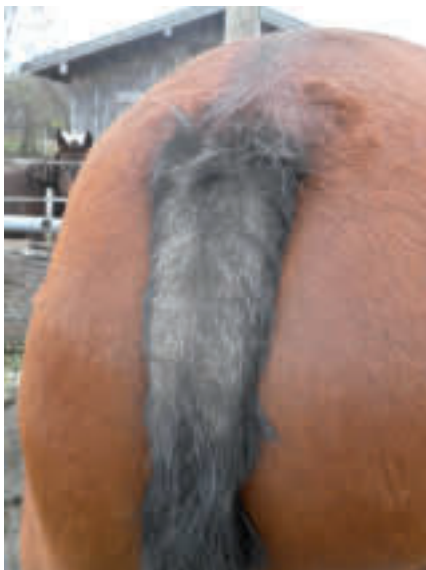


Abb. 2 Deutlich geschädigte Schweifrübe mit Haarbruch in der Regenerationsphase | Severely damaged base of the tail with hair breakage during regeneration.

Die Besitzer wurden ebenfalls zu dem Entwurmungsregime ihrer Pferde befragt. Alle teilnehmenden Pferde wurden laut Besitzerangaben regelmäßig (mindestens einmal pro Jahr) entwurmt. Die meisten Pferde (45%) wurden dreimal jährlich entwurmt. Genau ein Drittel der Patientenbesitzer entwurmt ihre Pferde zweimal im Jahr, 14% gaben an ihre Pferde viermal jährlich zu entwurmen und 8% entwurmt lediglich einmal pro Jahr.

Klinische Untersuchung

Die Allgemeinuntersuchung war bei allen Pferden unauffällig. Bei der speziellen Untersuchung der Haut zeigten vier Pferde keine Symptome bzw. Veränderungen der Haut. Bei allen anderen Pferden waren auch im Februar Hautveränderungen sichtbar. Der Haarbruch lag dabei als Symptom an erster Stelle. Das zweithäufigste Symptom war die Hautverdickung gefolgt von den Schuppen an dritter Stelle (Abbildungen 1–4). Keines der Pferde zeigte blutige oder eitrigere Hautveränderungen. Die durchschnittliche Punktzahl bei der klinischen Sommerekzem Beurteilung betrug 13 ± 10 Punkte. Besonders auffällig war, dass das Symptom „Schuppen“ sehr häufig und ausgeprägt vertreten war.

Funktioneller In vitro-Test (FIT)

Drei der eingeschickten Blutproben wurden vom Labor als nicht auswertbar eingestuft. Zwei Pferde zeigten keine Reaktionsbereitschaft auf die getesteten Insekten. Mit 81,3% (39/48) reagierten die meisten Tiere auf die Motte, ein nicht Sommerekzem relevantes Insekt. Erst an zweiter Stelle fand



Abb. 3 Verdickte Haut an der ventralen Bauchwand | Thickened skin at the ventral midline.



Abb. 4 Hochgradige Schuppenbildung | Severe scaling.

Tab. 2 Anzahl reagierender Pferde pro Insekt beim FIT | *Number of horses reacting per insect in FIT.*

FIT I (48 Ergebnisse)	Gnitze	Wadenstecher	KBM	ETF	Motte	Stechmücke	Pferdebremse	Hausfliege
Reagierende Pferde	35	22	21	28	39	30	21	13
Prozent	72,9	45,8	43,8	58,3	81,3	62,5	43,8	27,1

KBM Kriebelmücke ETF Eintagsfliege

sich die Gnitze mit 72,9% (35/48) gefolgt von der Stechmücke mit 62,5% (30/48) (Tabelle 2). Die Anzahl der Insekten, auf die die einzelnen Tiere reagierten, sind aus Tabelle 3 zu entnehmen. So reagierten beim FIT sieben Tiere auf alle acht und zwei Pferde auf keines der getesteten Insekten. Am häufigsten wurde, mit 10 Pferden, auf drei der getesteten Insekten angesprochen (Tabelle 3).

FIT und klinische Ausprägung

Vergleicht man den aktuellen klinischen Score mit den Ergebnissen des FIT, so war keine Korrelation der beiden Ergebnisse nachweisbar ($p = 0,207$). Das bedeutet im Einzelnen, dass Pferde mit einem hohen FIT-Wert nicht zwangsläufig einen hohen Score, sprich klinische Ausprägung des Sommerkzems zeigten und umgekehrt. Auch die beiden Pferde, die ein negatives Testergebnis im FIT hatten, zeigten bereits zu diesem frühen Zeitpunkt Symptome.

Cellular Antigen Stimulation Test (CAST)

Zwei der Proben waren aufgrund labortechnischer Probleme nicht auswertbar. Beim CAST zeigten sieben Pferde (14,2%) bei allen getesteten Insekten keine Reaktionsbereitschaft über

Tab. 3 Anzahl der reagierenden Tiere auf die acht Insekten im FIT | *Number of horses reacting to 1–8 insects in FIT.*

Anzahl Insekten	Anzahl reagierender Pferde
8	7
7	7
6	6
5	3
4	3
3	10
2	7
1	3
0	2

Tab. 4 Anzahl reagierender Pferde pro Insekt beim CAST

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

Tab. 5 Vergleich des Verwurmungsgrads mit klinischem Score und FIT | *Comparison of worm burdens with clinical score and FIT results.*

Wurmstatus	Sommerkzem-Score	Summe Punkte FIT
Keine (n = 14)	11	9,6
Leicht (n = 11)	12	4,4
Stark (n = 9)	9,7	7,6

den vom Labor als Schwellenwert angegebenen 250 pg/ml. Die meisten Pferde reagierten mit 71,4% auf die Gnitze (35/49), gefolgt von der Stechmücke mit 61,2% (30/49), der Kriebelmücke mit 21 Pferden (42,9%) und schließlich der Bremse (19/49; 38,8%) (Tabelle 4).

CAST und klinische Ausprägung

Beim CAST wurde die Reaktionsbereitschaft vom Labor lediglich mit einem Schwellenwert (>250 pg/ml) und nicht in Schweregraden angegeben. Die Höhe des tatsächlichen Wertes korreliert laut Laborbeschreibung nicht zwangsläufig mit der klinischen Ausprägung bzw. dem Schweregrad. Wie bereits beschrieben hatten beim CAST sieben Pferde ein negatives Testergebnis.

Gegenüberstellung CAST vs. FIT

Insgesamt zeigten im FIT und im CAST acht Pferde ein falsch negatives Test-Ergebnis, obwohl alle getesteten Pferde bereits

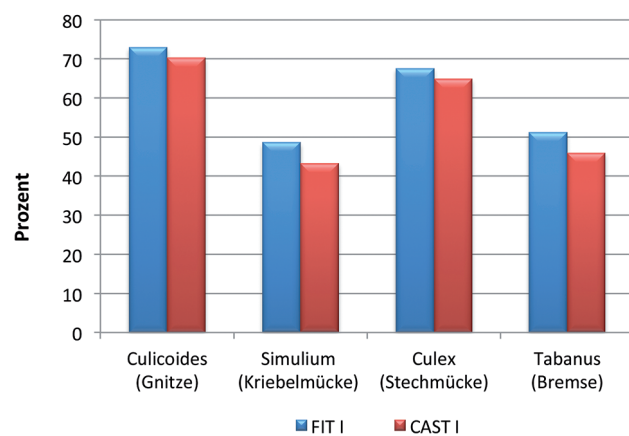


Abb. 5 Graphische Darstellung der prozentualen Verteilung der Allergiebereitschaft auf die in beiden In vitro-Tests getesteten vier Allergene im Vergleich | *Allergic reaction to the 4 allergens in both in-vitro tests.*

mindestens eine Saison deutliche Anzeichen von SE zeigten. Hier schnitt der FIT als besserer und verlässlicherer Test ab, da er deutlich weniger falsch negative Pferde beinhaltete (FIT $n = 2$) als der CAST (CAST $n = 7$). Verglich man die Häufigkeit der in beiden Tests untersuchten Insektenallergene (Gnitze, Stechmücke, Bremse, Kriebelmücke), so deckten sich die Ergebnisse sowohl in der Reihung der am häufigsten/wenigsten häufig vorkommenden Insekten, als auch in der Anzahl positiver Reaktionen pro Insekt beinahe zu 100% (Abb. 5).

Kotuntersuchung

Im Rahmen der Kotuntersuchung wurden 34 Pferde getestet. Bei den übrigen Pferden war es zum Untersuchungszeitpunkt aufgrund der Haltung (Offenstall) oder dem Verhalten (unkooperativ, keine rektale Kotgewinnung möglich) nicht möglich, eine dem Pferd sich zuzuordnende Kotprobe zu gewinnen. Insgesamt zeigten 41% (14/34) der Pferde aktuell keine Ausscheidung und bei 59% (20/34) der Pferde war eine Verwurmung nachweisbar. Diese ließ sich noch in stark ($n = 9$) und leicht verwurmt ($n = 11$) aufteilen. Mit 85% (17/20) waren die Pferde am häufigsten mit Strongyliden befallen. Hierbei wiesen neun Pferde einen massenhaften und acht Pferde einen leichten Befall auf. Bei drei Pferden konnten Wurmeier von Anaplocephala und bei einem Tier Parascarisidae nachgewiesen werden. Der Status der Wurmbürde wurde anschließend sowohl mit dem klinischen Sommerkzem-Score als auch mit dem FIT verglichen (Tab. 5). Beim Vergleich des Grades der Verwurmung und dem klinischen Score-Ergebnis der Pferde zeigte sich keine statistisch signifikante Korrelation. Beim Vergleich der Wurmbürde mit dem FIT Ergebnis zeigte sich, dass stark verwurmete Tiere einen signifikant niedrigeren FIT aufwiesen ($p = 0,0324$) als leicht bzw. nicht verwurmete Pferde. Ein falsch positives Ergebnis des Allergietests, ausgelöst durch eine starke Verwurmung des Tieres, war somit eher unwahrscheinlich.

Diskussion

Bis heute ist das Sommerkzem des Pferdes ein großes wirtschaftliches Problem, da es für diese Erkrankung keine befriedigenden Behandlungsvorschläge gibt. So wird die Erkrankungshäufigkeit für aus Island importierte Tiere auf bis zu 70% geschätzt (Rüsbüldt 1997). Doch schon seit längerem ist die Erkrankung nicht mehr nur als „typische Islandpferdekrankheit“ auf diese Rasse beschränkt, sondern weitet sich auf alle Rassen, Geschlechter und Farben aus. Umso wichtiger ist es, diese Erkrankung frühzeitig auch in der symptomfreien Zeit zu diagnostizieren.

Für die Diagnostik wurden die beiden gebräuchlichen in-vitro Tests FIT und CAST ausgewählt. Beide sind in Deutschland etabliert und erhältlich. Der FIT testet neben den SE-auslösenden Insekten noch weitere kreuzreagierende Allergene, die die Genauigkeit des Tests erhöhen sollen (Geiben 2003, Morris und Lindborg 2003).) Beide Tests sollen auch in der allergenfreien Zeit (Winter) zuverlässige Ergebnisse liefern (Steidle 2009, Kobelt 2001). In der Studie von Kobelt (2001) reagierten zwar auch 50% der gesunden Tiere im FIT positiv, aber die Tests zeigen ja auch lediglich die Reaktionsbereitschaft an nicht ob und wann das Tier tatsächlich auch an einem SE erkrankt wird.

In dieser Studie wurde bei 51, seit mindestens einer Saison an SE erkrankten Pferden vor Beginn des Insektenflugs und somit der Allergendisposition (Februar/Anfang März) der FIT und der CAST durchgeführt und die Ergebnisse untereinander und mit der klinischen Ausprägung des SE verglichen. Hierbei zeigten die beiden Tests im direkten Vergleich durchweg ähnliche Ergebnisse hinsichtlich der Reaktion und der Häufigkeit auf die in beiden Tests getesteten Insekten. Jedoch war der FIT mit nur zwei falsch negativ getesteten Tieren, im Vergleich zum CAST mit sieben falsch negativ getesteten Pferden, der Test mit der deutlich höheren Sensitivität und somit Zuverlässigkeit. Somit ließ sich die Aussage von De Weck und Sanz (2004) – der Histamin Release Test (FIT) und der CAST korrelieren relativ gut ($r = 0,4$ bis $0,6$) – nur bedingt bestätigen. Nur 72,9% der SE-Pferde reagierten in unserer Studie im FIT auf *Culicoides nubeculosus*, deren Speichelproteine gemäss neuerer Literatur (Lagner et al. 2008 und 2009, Shrestha et al. 2015), primär für das SE verantwortlich sein sollen. Somit konnten die beiden Tests nur bei ca. drei Viertel der SE-Pferde unserer Studie diese Reaktionsbereitschaft nachweisen. Es zeigte sich zudem im FIT keine Korrelation von Sensibilisierungsgrad gegen *Culicoides nubeculosus* und dem Grad der klinischen Ausprägung. Dies deutet darauf hin, dass nicht nur *Culicoides nubeculosus*, sondern eventuell auch andere Insekten an der komplexen Erkrankung Sommerkzems beteiligt sind. Ob diese Insekten (vor allem die nicht-blutsaugenden) allerdings an der klinischen Ausprägung des Sommerkzems tatsächlich beteiligt erscheint eher unwahrscheinlich. In der Literatur wird von einer Dominanz von *Culicoides* als „der“ Ursache für das Sommerkzem bei Pferden ausgegangen. Möglicherweise zeigen die Testergebnisse lediglich eine insgesamt gesteigerte Allergiebereitschaft betroffener Pferde. Ob es schlussendlich Sinn macht, bei Sommerkzemern nicht nur die Sensibilisierung gegen *Culicoides* sondern auch gegen andere Insekten zu prüfen, kann durch die vorliegende Studie nicht geklärt werden und sollte kritisch geprüft werden. Gegen eine einzige oder nur sehr wenige allergieauslösende – und damit pathogenetisch relevante Allergen-produzierende – Insektenarten sprechen möglicherweise die sehr unterschiedlichen klinischen Ausprägungen und Verlaufsfornen des Sommerkzems, die sich auch in dieser Studie deutlich zeigten. Die Studie deutet aber darauf hin, dass auch die im FIT getesteten, primär nicht am Sommerkzem-Komplex beteiligten Insekten (Motte, Eintagsfliege, Hausfliege) und der ebenfalls getestete Wadenstecher mit ihren kreuzreagierenden Allergenen das Ergebnis des FIT-Tests im Sinne eines verstärkt positiven Ergebnis beeinflussen. Inwieweit dies einen Rückschluss auf die Sensitivität oder Treffsicherheit des FIT-Tests hat, bleibt spekulativ.

Filterte man in der vorliegenden Studie jedoch aus dem FIT die im CAST nicht getesteten (Kreuz-) Allergene heraus, dann wurden beim FIT, ebenso wie beim CAST, je sieben Tiere falsch negativ getestet. Dies zeigt, dass auch die im FIT getesteten, primär nicht am Sommerkzem-Komplex beteiligten Insekten (Motte, Eintagsfliege, Hausfliege) und der ebenfalls getestete Wadenstecher mit ihren kreuzreagierenden Allergenen eventuell zur höheren Sensitivität und somit Treffsicherheit des FIT im Vergleich zum CAST beitragen.

Klinisch gesunde wie auch an Sommerkzem erkrankte Pferde zeigten im Intrakutantest wie auch im In vitro-Test häufig Reaktionen mit Extrakten aus der nicht hämopathogen Ein-

tagsfliege und der ebenfalls nicht blutsaugenden, in Nordamerika heimischen Feuerameise (*Geiben* 2003, *Morris* und *Lindborg* 2003). Dies ließ sich auch in dieser Studie bestätigen. So war beim FIT die Motte, als nicht blutsaugendes Insekt, mit über 80% das Insekt, auf das die meisten Pferde positiv reagierten. Ebenfalls sprachen fast 60% der Tiere beim FIT auf die Eintagsfliege mit einer allergischen Reaktionsbereitschaft an. Die Bedeutung dieser Allergene für eine insgesamt erhöhte immunologische Reaktionsbereitschaft der Pferde, das FIT-Testergebnis und der Sommerkezemerkrankung ist bisher unklar. Inwieweit der FIT dadurch bei klinisch (noch?) gesunden Pferden ein evtl. falsch positives Ergebnis suggerieren kann, sollte weiterführend geklärt werden. Untersuchungen dazu, ob und wann Pferde mit einem positiven FIT an einem Sommerkezem erkranken werden, liegen bisher nicht vor. Ebenso liegen bisher keine jahreszeitlichen bzw. über mehrere Jahre überprüfte Verläufe von gesunden und an SE erkrankten Pferden im FIT vor.

Der CAST zeigte im Vergleich zum FIT eine geringfügig höhere Laborsicherheit. So waren beim FIT die Blutproben von drei Pferden, im CAST von zwei nicht auswertbar. Dies bedeutet für den Tierarzt und Pferdebesitzer einen deutlichen Mehraufwand an Zeit und Kosten.

In der vorliegenden Studie bestand keine Korrelation zwischen der Höhe des FIT-Testergebnisses und der tatsächlichen klinischen Ausprägung im Februar. Durch die Angabe der Höhe der Allergiebereitschaft (ggr.-hgr.) auf die einzelnen Allergene wird beim FIT möglicherweise ein Rückschluß auf die klinische Ausprägung der Allergie suggeriert. Beim CAST wird dagegen nur ein Schwellenwert angegeben, der im Falle des Überschreitens, als positive Allergiebereitschaft gewertet wird. Interessanterweise zeigten mehrere Pferde bereits im Februar deutliche klinische Zeichen eines Sommerkezems bei niedrigen FIT-Ergebnissen. Es ist daher keine Aussage über den Schweregrad der klinischen Ausprägung der Erkrankung in Bezug auf die Höhe der Allergiebereitschaft im Allergietest möglich oder sinnvoll. Dies ist sicherlich auch aus forensischer Sicht, in Bezug auf Ankaufuntersuchungen, interessant. Hierbei ermöglicht der FIT zwar auch in der symptomfreien Zeit eine sensitive Aussage bezüglich der Allergiebereitschaft des getesteten Pferdes, eine sichere Aussage hinsichtlich sommerkezempositiv oder -negativ kann jedoch nicht getroffen werden. Die Höhe des Testergebnisses im FIT gibt zudem keine Auskunft über die Höhe der tatsächlichen klinischen Ausprägung des SE. Das heißt, Pferde mit niedriger FIT-Punktzahl können im Sommer mit hochgradigen Symptomen reagieren, ebenso vice versa.

Studien aus der Humanmedizin konnten zeigen, dass in Entwicklungsländern mit starker Helmintheninfektionsprävalenz allergische Erkrankungen bei weitem nicht so apparent sind, wie in Industrieländern (*Bell* 1996, *Cookson* und *Moffat* 1997). Die These, dass eine starke Wurmbelastung bei Fohlen zu einer geringeren Allergieausprägung (z.B. COB oder SE) führen wird auch für das Pferd vermutet. *Kaul* (1998) berichtete von zwei vorberichtlich an Sommerkezem erkrankten, im FIT aber negativen Pferden, die nach zweimaliger Entwurmung trotz Stallhaltung und wenig Insektenkontakt plötzlich eine deutliche Sensibilisierung der Basophilen im FIT gegen *Culicoides nubeculosus* zeigten. Auch in Studien an anderen Tierarten wurde der schützende Effekt von Helmin-

theninfektionen durch Immunmodulation (Mäuse-, Schweine- und Rinderversuche) weiter unterstützt (*Bashir* et al. 2002, *Graham* et al. 2001, *Hurst* et al. 2006). Beim Vergleich der Ergebnisse der Kotuntersuchung der Pferde mit dem zeitgleich durchgeführten Allergietest konnte in unserer Studie keine Korrelation zwischen den klinischen Score-Werten und dem Schweregrad der Wurmbürde festgestellt werden. Ähnlich wie in der Humanmedizin beschrieben zeigte sich jedoch eine signifikante Korrelation zwischen dem Schweregrad des FIT und dem Ausmaß der Verwurmung. Stark verwurmete Pferde hatten einen signifikant niedrigeren FIT im Vergleich zu nicht bzw. nur leicht verwurmeten Tieren. Dies würde sich damit erklären lassen, dass das Immunsystem mit dem Verwurmungsstatus der Pferde beschäftigt war und daher weniger auf das allergische Geschehen reagieren konnte. Ähnliches vermutete *Kobelt* (2001). Sie stellte in ihrer Studie bei einigen Islandpferden einen Abfall der Reaktionsbereitschaft auf *Culicoides nubeculosus* während der Sommermonate fest.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl der FIT als auch der CAST zur Identifizierung einer Allergiebereitschaft für das Sommerkezem genutzt werden können. Die Allergiebereitschaft im Testergebnis korreliert jedoch nicht mit dem Ausmaß des klinischen Krankheitsbildes. Der Grad der Verwurmung hatte in unserer Studie einen negativ proportionalen (stark verwurmt = niedriger FIT) auf das Testergebnis.

Literatur

- Baselgia S., Doherr M., Mellor P., Torsteinsdottir S., Jermann T., Zurbruggen A., Jungi T., Marti E.* (2006) Evaluation of an in vitro sulphidoleukotriene release test for diagnosis of insect bite hypersensitivity in horses. *Equine Vet. J.* 38, 40-6
- Bashir M., Andersen P., Fuss I., Shi H., Nagler-Anderson C.* (2002) An enteric helminth infection protects against an allergic response to dietary antigen. *J. Immunol.* 169, 3284-3292
- Bell R.* (1996) IgE, allergies and helminth parasites: a new perspective on an old conundrum. *Immunol. Cell Biol.* 74, 337-345
- Cookson W., Moffat M.* (1997) Asthma: an epidemic in the absence of infection? *Science* 275, 41-42
- De Weck A., Stadler B., Urwyler A., Bühlmann W., Bühlmann R.* (1993) Cellular allergen stimulation test (CAST) - a new dimension in allergy diagnostics. *Allergy Clin. Immunol. News* 5, 9-14
- De Weck A., Sanz M.* (2004) Cellular allergen stimulation test (CAST) 2003, a review. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 14, 253-273
- Ferroglio E., Pregel P., Accossato A., Taricco I., Bollo E., Rossi L., Triscioglio A.* (2006) Equine *Culicoides* hypersensitivity: evaluation of a skin test and of humoral response. *J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med.* 53, 30-33
- Gehlhar K., Schlaack M., Becker W., Bufe A.* (1999): Monitoring allergy immunotherapy of pollen-allergic patients: the ratio of allergen-specific IgG4 to IgG1 correlates with clinical outcome. *Clin. Exp. Allergy* 29, 497-506
- Geiben T.* (2003) Untersuchungen zum Sommerkezem sowie zum Einfluss des Immunmodulators Baypamun N® auf die Typ I-Allergie der Pferde. *Diss. Med. Vet. Hannover*
- Graham S., Trees A., Collins R.* (2001) Down-regulated lymphoproliferation coincides with parasite maturation and with the collapse of both gamma interferon and interleukin-4 response in a bovine model of onchocerciasis. *Infect. Immun.* 69, 4313-4319
- Halldorsdottir S., Larsen H., Mehl R.* (1989) Intradermal challenge of Icelandic horses with extracts of four species of the genus *Culicoides*. *Res. Vet. Sci.* 47, 283-287
- Heck H.* (1991) Neues Lexikon der Pferdekrankheiten, Loseblattsammlung Interest-Verlag, Kissingen

- Hurst M., Lola S., Lindberg R. (2006) Immunomodulation of the hepatic egg granuloma in *Schistosoma japonicum*-infected pigs. *Parasite Immunol.* 28, 681-686
- Janda J., Lehmann M., Luttmann W., Marti E. (2015) Cloning and expression of recombinant equine interleukin-3 and its effect on sulfidoleukotriene and cytokine production by equine peripheral blood leukocytes. *Vet. Immun. Immunopathol.* 163, 202-209
- Kaul S. (1998) Typ I-Allergie beim Pferd: Prinzipielle Entwicklung eines funktionellen in-vitro Nachweises. *Diss. Med. Vet. Hannover*
- Kobelt C. (2001) Zum Sommerekzem, eine Typ I-Allergie beim Islandpferd: Verlauf der in vivo-Sensibilisierung von basophilen Granulozyten, nachgewiesen mit einem funktionellen in vitro-Test (FIT). *Diss. Med. Vet. Hannover*
- Kolm-Stark G., Wagner R. (2002): Intradermal skin testing in Icelandic horses in Austria. *Equine Vet. J.* 34, 405-410
- Lagner K. F. A., Darpel K. E., Drolet B. S., Fischer A., Hampel S., Hesselhaus J. E., Mellor P. S., Mertens P. P. C., Leibold W. (2008) Comparison of cellular and humoral immunoassays for the assessment of summer eczema in horses. *Vet. Immun. Immunopathol.* 122, 126-137
- Lagner K. F. A., Jarvis D. L., Nimtz M., Hesselhaus J. E., McHolland L. E., Leibold W., Drolet B. S. (2009) Identification, expression and characterization of a major salivary allergen (Cul s 1) of the biting midge *Culicoides sonorensis* relevant for summer eczema in horses. *Int. J. Parasitol.* 39, 243-250
- Lebis C., Bourdeau P., Marzin-Keller F. (2002) Intradermal skin tests in equine dermatology: a study of 83 horses. *Equine Vet. J.* 34, 666-671
- Mimura T., Amano S., Funatsu H., Yamagami S., Araie M., Kaji Y., Ishida Y., Usui T., Okamoto S. (2004) Correlations between allergen-specific IgE serum levels in patients with allergic conjunctivitis in spring. *Ocul. Immunol. Inflamm.* 12, 45-51
- Morris D., Lindborg S. (2003) Determination of 'irritant' threshold concentrations for intradermal testing with allergenic insect extracts in normal horses. *Vet. Dermatol.* 14, 31-36
- Morrow A., Quinn P., Baker K. (1986) Allergic skin reactions in the horse: response to intradermal challenge with fractionated *Culicoides*. *J. Vet. Med. B* 33, 508-517
- Quinn P., Baker K., Morrow A. (1983) Sweet itch: Response of clinically normal and affected horses to intradermal challenge with extracts of biting insects. *Equine Vet. J.* 15, 266-272
- Rieck R. (1954) Studies on allergic dermatitis (Queensland itch) of the horse: the aetiology of the disease. *Aust. J. Agric. Res.* 5, 109-129
- Rüsbüldt A. (2001) Sommerekzem, Erkennen, Vorbeugen, Behandeln. *Cadmos Verlag, 2. Auflage*
- Shresta M., Eriksson S., Schurink A., Andersson L. S., Sundquist M., Frey R., Broström H., Bergström T., Ducro B., Lindgren G. (2015) Genome-wide association study of insect bite hypersensitivity in Swedish-born Icelandic horses. *Heredity* , 366-374
- Steidle B. (2009) Felduntersuchungen zur Ätiologie und Diagnose des Sommerekzems beim Islandpferd sowie zur Verlaufskontrolle einer Prophylaxe und Therapie mit homöopathischen Komplex-Präparaten in Verbindung mit Eigenblut anhand der funktionellen In-vitro-Tests HRT und CAST. *Diss. Med. Vet. FU Berlin*
- Ungar-Waron H., Braverman Y., Gluckman A., Trainin Z. (1990) Immunogenicity and allergenicity of *Culicoides imicola* (Diptera: Ceratopogonidae) extracts. *Zentralbl. Veterinärmed. B.* 37, 64-72
- Wagner B., Siebenkotten G., Leibold W., Radbruch A. (2002): Expression of a 4-(hydroxy-3-nitro-phenyl) acetyl. (NP) specific equi-murine IgE antibody that mediates histamine release in vitro and a type I skin reaction in vivo. *Equine Vet. J.* 34, 657-665
- Wagner B., Radbruch A., Rohwer J., Leibold W. (2003) Monoclonal anti-equine IgE antibodies with specificity for different epitopes on the immunoglobulin heavy chain of native IgE. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 92, 45-60
- Wagner B., Miller W. H., Morgan E.E., Hillegas J. M. Erb H.N., Leibold W., Antczak D. F. (2006) IgE and IgG antibodies in skin allergy of the horse. *Vet. Res.* 37, 813-825
- Wilson A., Harwood L., Bjonsdottir S., Marti E., Day M. (2001) Detection of IgG and IgE serum antibodies to *Culicoides* salivary gland antigens in horses with insect dermal hypersensitivity (sweet itch). *Equine Vet.J.* 33, 707-713
- Wilson A., Harwood L., Torsteinsdottir S., Marti E. (2006) Production of monoclonal antibodies specific for native equine IgE and their application to monitor total serum IgE responses in Icelandic and non-Icelandic horses with insect bite dermal hypersensitivity. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 112, 156-70