

## 6. SUMMARY

Feeding of fleas proved to be a valuable aid in the diagnosis of hypersensitivity to fleas in dogs and cats; all 7 dogs and 5 cats with clinically diagnosed flea allergy dermatitis reacted to feeding of fleas. Of 11 dogs and 6 cats with no clinical signs of flea allergy dermatitis, two dogs reacted to feeding of fleas and these two dogs had immediate type hypersensitivity reactions to intradermal test with flea antigens.

Of 3 antigens tested in intradermal tests, the soluble whole flea antigen (FS) correlated best with flea-feeding results and the clinical diagnosis of flea allergy dermatitis in dogs; 67%, 33% and 11% of 9 dogs hypersensitive to fleas had positive reactions 15 minutes after injection of soluble whole flea antigen (FS), Greer antigen and whole flea membrane antigen (FM) respectively. Soluble whole flea antigen (FS) and flea salivary gland antigen (SG) correlated best with flea-feeding results and clinical diagnosis of flea allergy dermatitis in cats; all 5 cats hypersensitive to fleas reacted to these antigens.

Of the 6 cats and 9 dogs with no reactions to flea-feeding, none reacted to intradermal injection of antigens.

The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) used to measure IgE and IgG antibody levels against the flea antigens whole flea membrane antigen (FM), soluble whole flea antigen (FS), whole flea antigen (WF) and Greer antigen in serum of dogs did not yield significant results which could be used to diagnose flea allergy dermatitis .

It was shown that antibodies raised against flea salivary gland antigens in sheep can be used as a ligand in immunoaffinity chromatography for purifying flea antigens.

## 7. ERWEITERTE ZUSAMMENFASSUNG

Brigitte Slacek: Zur Diagnose der Flohallergie-Dermatitis bei Hunden und Katzen.

### Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Antigene aus adulten Flöhen (*Ctenocephalides felis felis*) auf ihre Verwendbarkeit zur Diagnose von Flohallergie-Dermatitiden bei Hunden und Katzen untersucht. Die Antigene wurden im Intradermaltest und im Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) eingesetzt. Gleichzeitig wurde die Reaktion von Hunden und Katzen mit und ohne klinische Anzeichen von Flohallergie-Dermatitis auf Flohstiche getestet. Aus Flohextrakten wurden ein Ganzflohantigen (WF), ein lösliches Antigen (FS), ein Membranantigen (FM), ein Darmantigen (GUT) und ein Speicheldrüsenantigen (SG) hergestellt. Vergleichend wurde ein kommerziell erhältliches Flohantigen (Greer) eingesetzt. Zur Antigenherstellung wurden die Flöhe homogenisiert und mit Ultraschall behandelt. Das Homogenat wurde nach Reinigung durch Zentrifugieren (15.000 g) als Ganzflohantigen (WF) bezeichnet. Der nach Ultrazentrifugieren (100.000 g) des Ganzflohantigen entstandene Überstand wurde als lösliches Antigen (FS) und das Zentrifugat als Membranantigen (FM) bezeichnet. Zur Herstellung von Darmantigen (GUT) und Speicheldrüsenantigen (SG) wurden diese Organe aus frischen Flöhen herauspräpariert und homogenisiert.

Ferner wurde die Möglichkeit der Reinigung von Flohantigenen mit Hilfe der Affinitätschromatographie mit polyklonalen Antikörpern gegen Flohspeicheldrüsenantigen als Liganden untersucht.

## Reaktion von Hunden und Katzen auf Flohstiche

Hunde (18) und Katzen (11) wurden je 15 nüchternen und in ihrem Bewegungsfreiraum begrenzten Flöhen für 15 Minuten ausgesetzt. Die Reaktionen auf die Stiche wurden makroskopisch 15, 30 und 60 Minuten sowie 24 Stunden nach dem Absetzen der Flöhe untersucht. Die Ergebnisse zeigten, daß die Beurteilung der Reaktion der Haut auf Flohstiche ein wertvolles Hilfsmittel in der Diagnose von Überempfindlichkeiten gegen Flohstiche bei Hunden und Katzen ist. Von den sieben Hunden und fünf Katzen mit klinisch diagnostizierter Flohallergie-Dermatitis reagierten alle Tiere auf Flohstiche mit Hautreaktionen. Von elf Hunden und sechs Katzen ohne klinische Anzeichen der Flohallergie-Dermatitis reagierten nur zwei Hunde auf Flohstiche. Diese beiden Hunde reagierten auch im Intradermaltest mit Greer Antigen und FS mit Überempfindlichkeitsreaktionen vom Soforttyp.

## Intradermaltest mit verschiedenen Flohantigenen

Im Intradermaltest wurden die selbst hergestellten Antigene in verschiedenen Konzentrationen und das Greer Antigen in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration intrakutan injiziert und die resultierenden Quaddeln 15, 30 und 60 Minuten sowie 24 Stunden nach der Injektion gemessen und bewertet. Als optimaler Ablesezeitpunkt für den Intradermaltest erwies sich 15 Minuten nach Injektion.

Von den drei an Hunden getesteten Antigenen (FS, FM, Greer), korrelierten die Ergebnisse mit FS am besten mit der klinischen Diagnose der Flohallergie-Dermatitis. Von neun Hunden mit nachgewiesener Überempfindlichkeit gegenüber Flöhen reagierten 15 Minuten nach Injektion sechs mit FS, drei mit Greer Antigen und einer mit FM mit positiv. Bei Katzen wurden

zusätzlich die Antigene GUT and SG eingesetzt. Mit den Reaktionen auf Flohstiche und der klinischen Diagnose Flohallergie-Dermatitis korrelierten am besten die Ergebnisse mit FS und SG; alle fünf Katzen mit nachgewiesener Flohallergie reagierten auf diese beiden Antigene im Intradermaltest positiv.

Die sechs Katzen und neun Hunde, die auf Flohstiche nicht reagierten, blieben auch im Intradermaltest mit allen Antigenen negativ.

#### Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Im ELISA zur Bestimmung von Antikörpern gegen Flohantigene im Serum von intradermal getesteten Hunden wurden die Antigene FM, FS, WF und Greer eingesetzt. Die Bestimmung von IgE- und IgG-Antikörpern in den Hundeseren erwies sich zur Diagnose von Flohallergie-Dermatitis als ungeeignet.

#### Immunoaffinitätschromatographie

Zur Induktion von Antikörpern wurden zwei Schafe mit Flohspeicheldrüsenantigenen und vier Schafe mit Flohmembranantigenen hyperimmunisiert. Die Schafe erhielten fünf intramuskuläre Injektionen mit insgesamt 45 µg Antigenproteinen. Immunoglobuline dieser sechs Schafe und von vier nicht immunisierten Schafen wurden als Liganden für die Immunoaffinitätschromatographie eingesetzt. Schafantikörper gegen Flohspeicheldrüsenantigene erwiesen sich als Liganden in der Immunoaffinitätschromatographie zur Reinigung von Flohantigenen als brauchbar. Das Elutionsprofil der Chromatographiesäule mit den Antikörpern als Liganden war größer als die der negativen Kontrollsäule, wenn

solubilisiertes Flohmembranantigen als zu reinigendes Flohantigen durch die Säule gegeben wurde.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß das lösliche Flohantigen FS und das Speicheldrüsenantigen im Intradermaltest zur Diagnose der Flohallergie-Dermatitis brauchbar ist, während das Membranantigen und das kommerzielle Antigen nicht verwendbar erscheinen.