

7. SUMMARY / ERWEITERTE ZUSAMMENFASSUNG

SUMMARY

Hypersensitivity to fleas in dogs was determined by studying their reactivity to challenge with living fleas. Thirtyseven dogs were clearly identified as either hypersensitive (n= 18) or not-hypersensitive (n= 19) to flea bites and only 3 of 40 dogs exhibited a doubtful reaction to this challenge.

A preliminary intradermal skin test (IDST), using triplicate injections of various flea antigens and positive and negative control substances, was conducted in 4 dogs to determine the variability of the skin response to identical injections. Deviations of ≥ 3 mm within a triplicate were found in only 4.2% of the triplicate injections.

A semi-purified soluble antigen made from whole fleas (FS-Antigen) was separated by high-performance liquid chromatography (HPLC). FS-Antigen, the fractions obtained from HPLC separation, an antigen reconstituted from those fractions and a commercial flea antigen (Greer-Flea Antigen) were compared in IDST in dogs. These 37 dogs had previously been classified according to their reaction to feeding fleas and to clinical evidence of flea allergy dermatitis (FAD). Results of this trial revealed:

- The results of an IDST were dependent on the grading system being used to define positive reactions.
- A grading system where a positive reaction was defined as 5 mm greater than or equal to the negative control identified 94.1% of dogs which reacted positive to flea feeding (ff+), whereas dogs non-reactive the flea challenge (ff-) were not recognised in this assay. The grading system described was superior to two other systems in terms of correctly identifying ff+ and ff- dogs.

- Fractionation of FS-Antigen using HPLC damaged allergenic properties of the flea extract.
- Although FS-Antigen used in IDST seemed to be a reliable tool for the diagnosis of FAD in dogs, irritant substances in the extract may interfere with this test and cause false positive reactions in ff- dogs, where others than the recommended grading system are used.
- Comparison of three FS-Antigen extracts on SDS-PAGE revealed that the extraction method yielded a consistent preparation.
- The components of FS-Antigen had molecular weights < 66.2 kDa under reducing conditions on SDS-PAGE. As a native preparation the molecular weights of FS-Antigen ranged from 2 000 kDa to < 12.4 kDa established by HPLC.
- An ELISA for measuring anti-flea antibody levels against FS-Antigen and HPLC-fractionated FS-Antigen in the sera of dogs did not reveal significant differences between ff+ and ff- dogs.
- Sera from groups of dogs positive and negative to flea feeding and dogs with and without clinical signs of FAD were tested in Western blots against FS-Antigen. No distinction between the patterns of antibody reactivity to the antigen bands was evident between these groups.

Ralf Stolper: Analyse von Flohantigenen und Bewertung von Intradermaltests zur Diagnose der Flohallergie-Dermatitis beim Hund.

ERWEITERTE ZUSAMMENFASSUNG

Einleitung

Allergische Reaktionen auf Flohstiche rufen in Hunden eine Erkrankung hervor, die als Flohallergie-Dermatitis (FAD) bezeichnet wird. FAD ist die häufigste allergische Hauterkrankung des Hundes. Die klinischen Symptome der FAD sind nicht pathognomonisch und eine standardisierte Methode zur Diagnose dieser Erkrankung gibt es noch nicht. Kommerziell erhältliche Flohextrakte, die sowohl diagnostisch im Intradermaltest als auch zur therapeutischen Desensibilisierung eingesetzt werden können, bestehen aus Ganzkörperextrakten von Flöhen. Ihr Wert in beiden Einsatzbereichen wird in der Literatur gegenwärtig kontrovers diskutiert.

Zielsetzungen

Ziel der Studie war es, ein vorgereinigtes lösliches Flohantigen (FS-Antigen; SLACEK u. OPDEBEECK 1991) mit Hilfe der High Performance Liquid Chromatography (HPLC) weiter zu reinigen, und die erhaltenen Fraktionen (A, B, C, DE, F und G) im Intradermaltest zu untersuchen.

In der veterinärmedizinischen Literatur über Intradermaltests mit verschiedenen Antigenen findet man ein weites Spektrum an Bewertungskriterien, von denen die am häufigsten zitierten in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden.

Ferner wurde die molekulare Zusammensetzung des FS-Antigens mit Hilfe der Sodium Dodecyl Sulphate-polyacrylamide Gel

Electrophoresis (SDS-PAGE) und der HPLC untersucht sowie der Wert von Western Blots als diagnostisches Hilfsmittel zur Erkennung von flohallergischen Hunden überprüft.

Versuchstiere

Die Reaktionen von 40 Hunden auf Flohstiche wurden nach der Methode von SLACEK und OPDEBEECK (1991) getestet. An 18 Hunden wurden Überempfindlichkeitsreaktionen festgestellt, 19 Hunde zeigten keine makroskopisch sichtbaren Reaktionen auf die Flohstiche. Zweifelhafte Reaktionen wurden an drei Tieren festgestellt; diese Tiere wurden von weiteren Versuchen ausgeschlossen.

Intradermaltest mit Flohantigenen

Antigene und Kontrollsubstanzen mußten nach der Injektion einen einheitlichen Quaddeldurchmesser aufweisen, um in die spätere Bewertungen einbezogen werden zu können. Die Hautreaktionen wurden im Zeittakt von 15 und 30 Minuten sowie 24 Stunden nach der Injektion gemessen.

Um Abweichungen von Reaktionen bei gleicher Injektionstechnik auf gleiche Substanzen zu untersuchen, wurde ein Vorversuch mit verschiedenen Flohantigenen sowie mit positiven und negativen Kontrollsubstanzen an vier Hunden durchgeführt. Die Substanzen wurden mit gleicher Technik jeweils an drei verschiedenen Stellen intrakutan injiziert. Abweichungen von mindestens 3 mm zwischen den Größen der Reaktionen der Injektionsstellen wurden bei 4,2% der Testinjektionen gefunden.

Das FS-Antigen wurde mit Hilfe der HPLC in sechs Fraktionen aufgetrennt. Zur Überprüfung etwaiger negativer Einflüsse des Chromatographie Prozesses auf das Antigen wurden die fünf Haupt-protein enthaltenden Fraktionen zu einem rekonstituierten Antigen (T) wiedervereinigt und vergleichend

mit dem Original-FS-Antigen sowie einem kommerziellen Ganzkörper Flohextrakt (Greer Laboratories) im Intradermaltest eingesetzt. Die Ergebnisse mit den chromatographisch getrennten Antigenen lassen erkennen, daß durch den chromatographischen Prozeß Eigenschaften des ursprünglichen FS-Antigens verlorengelassen werden. Die Reaktivität des wiedervereinigten Antigens im diagnostischen Hauttest war gegenüber den Reaktionen auf das Ausgangsantigen deutlich verringert. Mit dem kommerziellen Antigen wurden keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt.

Die Resultate der Intradermaltests sind in hohem Maße von den angewendeten Bewertungsmaßstäben abhängig. Beim Vergleich der Ergebnisse der Intradermaltests mit den direkten Reaktionen der Hunde auf Flohstiche brachte ein Bewertungssystem, das einen um 5 mm größeren mittleren Durchmesser einer Hautreaktion auf ein Antigen als der der Reaktion auf die negative Kontrolle als positiv definiert, die besten Resultate. Mit diesem Bewertungssystem wurde ein hoher Prozentsatz (94,1%) der flohallergischen Hunde korrekt erkannt, wenn das vorgereinigte FS-Antigen verwendet wurde. Falsch negative Reaktionen traten dabei nicht auf. Damit ist dieses Bewertungssystem den beiden anderen untersuchten Systemen eindeutig überlegen.

Auf den ersten Blick erscheint das FS-Antigen als verlässliches Werkzeug zur Diagnose der FAD. Jedoch ist zu bedenken, daß durch dieses Antigen auch bei Hunden ohne Allergie gegen Flohstiche zu einem hohen Prozentsatz (62,5%) deutliche Reaktionen hervorgerufen wurden. Die Durchmesser dieser Reaktionen waren mindestens 3 mm größer als die der Reaktionen hervorgerufen durch die negativen Kontrollen, was auf die Anwesenheit von störenden Substanzen schließen läßt, die bei der Anwendung subjektiver Bewertungskriterien in einem Intradermaltest zu falsch positiven Ergebnissen führen könnten.

Molekulare Charakterisierung des FS-Antigens

Drei unabhängig voneinander extrahierte FS-Antigen Präparationen wurden mit der SDS-PAGE untersucht. Die Molekülgrößen der in den drei Extrakten ermittelten Proteine waren identisch. Dies deutet auf die Reproduzierbarkeit der Extraktionsprozedur hin. Die Molekulargewichte unter reduzierten Bedingungen in der SDS-PAGE lagen in einem Bereich von < 66,2 kDa. Mit Hilfe der HPLC wurden bei nicht denaturiertem FS-Antigen ein Molekulargewichtsbereich von 2 000 bis < 12,4 kDa ermittelt.

Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der Anti-Floh-Antikörperspiegel in Seren von intradermal getesteten Hunden wurde im ELISA mit FS-Antigen und HPLC fraktioniertem FS-Antigen getestet. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Reaktionen flohallergischer und nicht-allergischer Tiere.

Western Blot Analyse

Um festzustellen, ob mit der Western Blot Technik bei Verwendung von FS-Antigen diagnostisch verwertbare Ergebnisse erhalten werden können, wurden Seren von intradermal auf Flohallergie positiv und negativ reagierenden Hunden untersucht. Diagnostisch verwertbare Ergebnisse wurden mit der Western Blot Technik nicht erhalten.

Wie in der Arbeit gezeigt wurde sind Ergebnisse eines Intradermaltestes in hohem Grade von den Bewertungskriterien der beobachteten Hautreaktionen abhängig. Daher sollte zu jedem neu entwickelten Test-Antigen sowohl ein experimentell abgesichertes Bewertungssystem zur Beurteilung der Hautreaktionen, als auch eine präzise technische Anweisung für die Durchführung des Testes erstellt werden, die strikt befolgt werden muß.