

6. Zusammenfassung

Chronische Atemwegserkrankungen, einer der Hauptgründe für eine verkürzte Nutzungsdauer von Sportpferden, treten vor allem bei im Stall gehaltenen Pferden unter ungünstigen Haltungsbedingungen (schlecht belüftete Ställe, hohe Stallstaubkonzentrationen) auf. Sie werden in vielen Fällen als allergische Reaktionen auf bestimmte Stallstaubkomponenten interpretiert, wobei Schimmelpilzsporen die Schlüsselrolle als auslösendes Allergen zugeschrieben wird. Über die Bedeutung des Expositionsmodus für eine eventuelle Sensibilisierung ist jedoch nur wenig bekannt. Ziel der vorliegenden Untersuchung war es daher festzustellen, ob eine Belastung mit Schimmelpilzen und Milben auf oralem Wege bzw. per Inhalationem bei jungen Versuchspferden ohne respiratorische Allergie zu unterschiedlichen klinischen oder serologischen Reaktionen auf eine massive experimentelle Antigenbelastung führte, die Rückschlüsse auf die beteiligten immunologischen Mechanismen zuließen.

Versuchsaufbau

- Versuchstiere: Haflingerpferde im Alter von 11 bis 16 Monaten (n=6)
- wiederholte Belastung mit einem Antigengemisch aus Milben und Schimmelpilzen auf oralem, inhalativem und subkutanem Wege (einmal wöchentlich mit dem Futter über fünf Wochen, einmal wöchentlich für 20 min inhalativ via Atemmaske über fünf Wochen, mittels subkutaner Injektion dreimal im Abstand von 10 bzw. 14 Tagen)
- Messung und Dokumentation klinischer und serologischer Reaktionen während der drei Versuchsphasen (klinische Parameter: zweimal täglich, Serumproben wöchentlich, Endoskopie vor und nach dem Inhalationsversuch)
- Vergleich mit drei Kontrollpferden (7, 19 und 23 Jahre alt), bei denen ausschließlich eine subkutane Antigenapplikation durchgeführt worden war.
- Während der Versuche Entnahme von Serumproben in definierten Zeitabständen (vor Versuchsbeginn zunächst Bestimmung der Ausgangstitel milben- und schimmelpilzspezifischer Antikörper im Serum der Pferde)

Ergebnisse

a) methodische Aspekte

- Entwicklung eines neuen Verfahrens der Antigenapplikation für die Inhalationsbelastung in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. W. Koch und Herrn H. Windt vom Institut für Toxikologie und Aerosolforschung der Fraunhofer Gesellschaft für angewandte Forschung e. V.; Vorteil: Mit der Applikation eines staubförmigen Aerosols aus Futterpartikeln sowie Schimmelpilz- und Milbenbestandteilen (ca. 40% der Partikel < 5µm und somit lungengängig) konnte die unter konventionellen Haltungsbedingungen stattfindende Antigenbelastung realistischer simuliert werden als mit ultraschallvernebelten Extrakten bestimmter Einzelantigene.
- Etablierung eines ELISA-Testsystems für die im Rahmen dieser Studie durchzuführenden Untersuchungen von Serumproben auf milben- und schimmelpilzspezifische Antikörper (Gesamtantikörperantwort und IgG), da mit einem zuerst verwendeten kommerziell erhältlichen ELISA-Testatz zum Nachweis allergenspezifischer IgE- Antikörper keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt werden konnten.

b) Reaktionen der Versuchspferde

- Keines der Tiere zeigte infolge der wiederholten Antigenbelastung klinische Anzeichen einer Allergie.

- Alle Pferde verfügten bereits vor der experimentellen Antigenbelastung über Serumantikörper gegen Milben und Schimmelpilze (Ausgangswerte der einzelnen Tiere streuten stark)
- Keines der Pferde zeigte einen Titeranstieg nach oraler Belastung.
- Nur bei einem Versuchspferd konnte nach der inhalativen Belastung ein geringer Titeranstieg milbenspezifischer Antikörper auf das Dreifache des Ausgangswertes beobachtet werden. Dieses Pferd zeigte während der zweiten inhalativen Belastung auch geringgradige klinische Symptome einer Dyspnoe.
- Nach subkutaner Applikation war bei allen Tieren ein deutlicher Anstieg an schimmelpilz- und milbenspezifischen Serumantikörpern im ELISA zu messen (bis zum Zehnfachen des Ausgangswertes).

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, daß bei Pferden weder die orale noch die inhalative Aufnahme hoher Milben- oder Schimmelpilzkonzentrationen zwangsläufig zu einer allergischen Reaktion führt. Dennoch weist das Vorliegen von Antikörpern gegen ubiquitär verbreitete Schimmelpilze und Milben im Serum der Pferde vor Versuchsbeginn auf einen zuvor stattgefundenen Antigenkontakt hin, welcher unter natürlichen Bedingungen nur auf oralem oder inhalativem Wege erfolgt sein kann. Warum trotz massiver inhalativer Antigenbelastung nur eines der sechs Versuchstiere mit einem leichten Titeranstieg reagierte, kann anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht abschließend geklärt werden. In dieser Untersuchung ist jedoch auffällig, daß alle sechs untersuchten Pferde trotz kontrollierter Belastung unter identischen Bedingungen weder bei der oralen noch bei der inhalativen Antigenexposition mit einer erkennbaren Immunantwort reagierten (selbst mit Hilfe des empfindlichen ELISA-Testsystems waren keine Effekte meßbar) und auch keine klinischen Anzeichen einer Allergie zeigten. Da jedoch alle sechs Tiere gegen dieselben Antigene nach subkutaner Applikation mit einer deutlichen antigenspezifischen Antikörperantwort gegen Schimmelpilze und Milben reagierten, ist bewiesen, daß während der oralen und inhalativen Belastung wirkungsvolle Antigene appliziert wurden und alle Tiere zu einer deutlichen Immunantwort in der Lage waren. Deshalb wird es für Nachfolgeuntersuchungen von vordringlichem Interesse sein, abzuklären, welche Mechanismen bei der oralen und inhalativen Applikation dieser Antigene für die Verhinderung einer Antikörperantwort verantwortlich waren. Möglicherweise handelt es sich dabei um dieselben Mechanismen, die die sechs Versuchpferde vor der Entwicklung einer klinisch manifesten Allergie schützten. Diese zu finden und zu analysieren sollte die Aufgabe weiterführender Untersuchungen zur Pathogenese von „Futtermittelallergien“ sein. Die vorliegenden Untersuchungen bieten dazu eine solide Ausgangsbasis.

Claudia Rade Detection of serological reactions in horses due to a controlled oral and inhalative challenge with moulds and storage mites

7.Summary

Chronic respiratory disease which is one of the major reasons for exercise intolerance in horses is commonly observed in stabled horses housed in poorly ventilated boxes being exposed to immense amounts of airborne dust. The syndrome is believed to be due to an allergic reaction to certain components of stable dust. Although the predominant role of fungal spores as offending agent in these hypersensitivity conditions has been confirmed by many working groups, the effect of altered mode of exposure to these antigens and its consequences for potential sensitization is poorly understood yet.

Therefore it was the aim of the present study to find out whether different modes of antigen exposure (per os / per inhalationem) led to clinical and serological reactions of young horses without any history of respiratory allergy to a massive challenge with moulds and mites. Some conclusions should be drawn towards immunological mechanisms being involved into the horses' mode of action

Study design

- animals: Haflinger horses (n=6; age ranged between 11 and 16 months)
- repeated oral, inhalative and subcutaneous antigen challenge with a mixture of moulds and storage mites (feeding a mould- and mite-contaminated diet once weekly for five weeks, inhalation of a mould- and mite-containing dust via face mask once weekly for 20 min over a period of five weeks or by subcutaneous injections repeated after 10 and 14 days, respectively)
- Clinical and serological reactions were monitored during the three challenge intervals (clinical parameters: twice daily, serum samples taken once weekly, endoscopy before and after inhalation challenge)
- Results of serum analysis were compared with those of three control horses (7, 19 and 23 years old) that were challenged by subcutaneous injection only
- Serum samples were harvested in defined intervals (before the first experimental antigen exposure basic values of serum antibodies directed towards mites or moulds were determined)

Results

a) methodology

- introduction of a new technique of antigen application for inhalation challenge in cooperation with Dr. W. Koch and Mr. H. Windt from the Institute for Toxicology and Aerosol Research of the "Fraunhofer Gesellschaft für angewandte Forschung e. V.", advantage: a mixture of feed dust, particular fungal and mite material (40% of particles < 5µm and thus inspirable) was employed in order to imitate antigen exposure under natural conditions more realistically than by means of ultrasonic nebulization of single-antigen extracts
- Serum samples were analyzed for mite- and mould-specific antibodies (humoral immune response in general and IgG) in an ELISA-system especially established for this study, because from the commercially available ELISA-testkit for detection of allergen-specific IgE, which first was employed for serum analysis, no reliable results could be obtained.

b) horses' response to experimental antigen challenge

- None of the animals developed clinical signs of allergy inspite of repeated antigen challenge
- All horses already had mite- and mould-specific antibodies before the experimental challenge (basic values varied in a wide range from one individual to another)
- Oral challenge did not induce a serological reaction in any horse.
- Only in one horse a slight increase in mite-specific antibody titer upon inhalation challenge (3 fold increase compared to basic values) was evident. In this horse even clinical signs of dyspnoea were observed during the second period of inhalation challenge.
- Sera taken after s.c.-injection of the antigens gave strong positive reactions in the ELISA (up to 10 fold increase compared to basic values)

From the present results it can be concluded that neither the ingestion nor the inhalation of excessive concentrations of moulds and mites inevitably leads to an allergic reaction in horses. On the other hand the presence of mould- and mite-specific antibodies in the sera of pre-challenge-horses indicates a **previous** exposure to these ubiquitous fungal and mite-specific antigens which must have taken place under natural conditions (i e. per os or per inhalationem) The reasons why only one of the six horses used in this trial showed a slight increase in mite-specific serum antibodies inspite of a massive inhalative antigen exposure cannot definitively be determined considering the present results. One remarkable aspect of the present study is that all horses participating in this trial inspite of controlled identical challenge conditions failed to show a detectable immune response (even with a sensible analysis-technique like ELISA no serological reactions were measured). The horses did not develop clinical signs of allergy either. After subcutaneous injection of the same antigens however all six horses reacted with a clear antigen-specific antibody response against moulds and mites. This is an evidence of the antigenicity of the preparations applied during oral and inhalative challenge and the ability of the examined horses to develop an adequate immune response. Therefore it will be of superior interest in following investigations to find out which mechanisms were responsible for suppression of an antibody response in the horses' sera during oral and inhalative antigen challenge. These are possibly the same factors that kept the horses from developing a clinically obvious allergy. It should be the aim of further research into pathogenesis of „feedstuff-allergy“ to detect and analyse them. The present results provide a solid basis for this.