

## 6. Zusammenfassung

Der funktionelle in-vitro Test (FIT) für Typ I-Allergien beim Pferd bietet die qualitative und quantitative Möglichkeit, eine Sensibilisierung der basophilen Granulozyten im Blut mit funktionellen membrangebundenen Antikörpern zu ermitteln. Dies kann sowohl spezifisch anhand Allergen induzierter Histaminfreisetzungen, als auch „generell“, durch ein Antiserum gegen Pferde-Immunglobuline induzierte Aktivierung, erfolgen.

Mit diesen Untersuchungen sollten unter Verwendung des FIT folgende Fragen bearbeitet werden:

1. *Läßt sich bei Pferden mit chronisch obstruktiver Bronchitis (COB) im peripheren Blut eine Sensibilisierung der basophilen Granulozyten gegen unterschiedliche Allergene nachweisen?*

In Zusammenarbeit mit der Tierärztlichen Klinik in Ottersberg wurden 46 Patienten, Pferde unterschiedlicher Rasse und Alters, mit klinischen Symptomen einer COB und 10 gesunde Tiere ohne Verdacht oder Anzeichen einer COB ein oder mehrfach im FIT untersucht. Diese Tiere wurden in Hinblick auf den Sensibilisierungsgrad ihrer basophilen Granulozyten gegen folgende Allergen-Präparationen geprüft: Dermatophagoides pteronyssinus, Dermatophagoides farinae, Hausstaub, Schimmelpilze, Baumpollen, Gräserpollen und Herbstpollen. In den eingesetzten Konzentrationen waren bei diesen Allergen-Präparationen keine unspezifischen Histaminfreisetzungen aus den basophilen Granulozyten zu beobachten. Mit diesen Präparationen zeigten die Zellen der untersuchten Tiere qualitativ und quantitativ individuelle Allergen induzierte Reaktionen. Eine positive Allergen induzierte Reaktion im FIT zeigt an, daß beim untersuchten Tier eine spezifische Sensibilisierung gegen das entsprechende Allergen vorliegt.

Von den 46 Pferden mit COB reagierten 40 mit einer oder mehreren Allergen-Präparationen, während 6 keine Reaktion auf die hier untersuchten Allergene zeigten. Gleichwohl wiesen diese Pferde eine deutliche „generelle“ Sensibilisierung auf, und sind daher vermutlich gegen hier nicht erfasste Antigene sensibilisiert. Bei 4 von 10 gesunden Kontrolltieren war ebenfalls eine Allergen-spezifische Sensibilisierung gegen ein oder mehrere Allergene festzustellen

Im statistischen Vergleich reagierten die an COB erkrankten Tiere mit 3 von 7 Allergen-Präparationen signifikant häufiger als die gesunden Kontrollen: Dermatophagoides pteronyssinus ( $p < 0,001$ ), Dermatophagoides farinae ( $p < 0,01$ ) (beides Hausstaubmilben) und Hausstaub ( $p < 0,05$ ). Wurde die ätiologische Fraktion (EF) berechnet, so lagen die Werte für Dermatophagoides pteronyssinus und Dermatophagoides farinae zwischen 76% und 78%.

Dies besagt, daß Milbenallergene bei den hier untersuchten Pferden zu  $\frac{1}{4}$  ursächlich zur Entwicklung ihrer COB beigetragen haben. Dafür spricht auch die gleichfalls hohe ätiologische Fraktion von Hausstaub (66%), die zum großen Teil aus Milbenallergenen besteht (VIRCHOW et al., 1976).

2. *Inwiefern beeinflussen Glucocorticoesteriode den Sensibilisierungsgrad von basophilen Granulozyten bei Pferden mit Sommereczem oder chronisch obstruktiver Bronchitis (COB)?*

Bei insgesamt 9 Pferden mit Sommereczem und 4 Pferden mit COB wurde aus klinischen Gründen eine Corticosteroid-Therapie mit:

- a) Prednisolon-21-acetat (i.m.; bei 2 Pferden mit Sommereczem),
- b) Prednisolon (oral; bei 3 Pferden mit Sommereczem aufgrund einer akuten Bronchitis),
- c) Triamcinolon (i.m.; bei 4 Pferden mit COB) oder mit
- d) Dexamethason-21-acetat (lokal; bei 4 Pferden mit Sommereczem) durchgeführt.

Zudem wurde die Prednisolon-21-hydrogensuccinat-Wirkung in-vitro (an Zellen von einem Pferd mit Sommereczem) untersucht.

Unmittelbar nach der Corticosteroid-Behandlung wurde zuerst ein drastischer Abfall des Histamingehaltes im Blut, einhergehend mit einer deutlichen Reduktion der Anzahl der basophilen Granulozyten (unter 0,1%), beobachtet. Bereits unter ausschleichender Dosisreduktion (perorales Prednisolon), regelmäßig aber nach dem Absetzen der Behandlung, erholte sich der Histamingehalt im Blut mit einem zeitgleichen Wiederanstieg der basophilen Granulozyten. Dabei war teilweise ein deutlich verändertes Sensibilisierungsprofil im Hinblick auf die Allergen-spezifische Reaktion der basophilen Granulozyten feststellbar. Demnach scheint in Folge einer Corticosteroid-Therapie eine Aktualisierung mit sensibilisierenden Antikörpern aufzutreten.

Im Gegensatz zu diesen erheblichen Veränderungen der Sensibilisierung von basophilen Granulozyten nach systemischer Corticosteroid-Therapie, war diese weder nach lokaler Behandlung, noch nach ein- und zweistündiger Prednisolon-Exposition in vitro von basophilen Granulozyten, zu beobachten.

In unterschiedlichen Ansätzen sprachen diskordante Ergebnisse nach Allergen-Stimulation und Aktivierung mit Antiserum gegen Pferde-Immunglobuline dafür, daß auf basophilen Granulozyten des Pferdes mindestens zwei unterschiedliche Immunglobulin-Isotypen vorkommen und sensibilisierend wirken können.

3. *Kann durch eine Behandlung mit Ökozon, Allergostop<sup>®</sup> 1 oder Inso!<sup>®</sup> Dermatophyton der Sensibilisierungsgrad basophiler Granulozyten bei Pferden mit Sommerekzem beeinflusst werden?*

Unter Pferdehaltern werden aufgrund anekdotischer Berichte diverse Mittel ohne ausreichende wissenschaftliche Grundlage zur Therapie des Sommerekzems eingesetzt. An insgesamt 20 Pferden mit Sommerekzem wurde für die Mittel Ökozon (8 Pferde), Allergostop<sup>®</sup> 1 (6 Pferde) und Inso!<sup>®</sup> Dermatophyton (6 Pferde) überprüft, ob sie einen nachweisbaren Einfluß auf die Sensibilisierung basophiler Granulozyten haben. Eine dauerhafte und zuverlässige Verminderung der „generellen“ oder der spezifischen Sensibilisierung gegen *Culicoides nubeculosus* konnte nicht nachgewiesen werden.

## 7. Summary

Gaby Bruennlein: **A functional in vitro-test (FIT) for type I allergy in horses: Monitoring of allergic sensitisation in horses with and without chronic obstructive bronchitis (COB) as well as influences of therapeutic regimes on the degree of sensitisation of patients**

The functional in vitro-test (FIT) for type I allergies in horses provides the possibility of monitoring qualitatively as well as quantitatively a sensitisation of basophiles with functional membrane-bound antibodies. Histamine release by triggered basophiles can be achieved through either allergen specifically recognized by the sensitising antibodies, or "generally" via antiserum against all equine immunoglobulin isotypes. The investigations presented here aim to answer the following questions applying mainly the FIT:

- 1 *Do horses affected with or without chronic obstructive bronchitis (COB) show a specific sensitisation of their peripheral blood basophiles for selected allergens?*

Forty six horses of different age and breed, all patients of the Veterinary Clinics in Ottersberg/Germany, with clinical signs of COB were examined once or repeatedly by means of the FIT and haematological parameters. In addition 10 clinically healthy horses were examined. All of these horses were tested for qualitative and quantitative sensitisation of their basophiles against allergen preparations such as: *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, house dust, molds, tree pollen, grass and late autumn pollen. The concentrations used were pretested for avoiding any non-specific histamine release from basophiles. Qualitatively and quantitatively they caused individually differing reactions. A positive allergen induced reaction in the FIT indicates a specific sensitisation against the corresponding allergen of the examined horse.

Forty out of the 46 horses with COB displayed positive FIT-results with one or more allergens. The remaining 6 diseased horses did not react to any of the allergens tested here. Nevertheless, they showed a level of "general" sensitisation, indicating that their relevant antigens were not among those tested in this study. Four out of the ten healthy horses showed specific sensitisation against one or more allergens as well. Statistical comparisons proved 3 out of seven allergens to trigger basophiles from horses with COB more frequently than those from healthy once: *Dermatophagoides pteronyssinus* ( $p < 0,001$ ), *Dermatophagoides Farinae* ( $p < 0,01$ ), both house dust mites and house dust itself ( $p < 0,05$ ). Calculating the etiologic

fraction (EF), values between 76%-78% were obtained for: *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae* suggesting an etiological role for these mite-allergens in the establishment of COB for three quarters of the horses examined here. This is supported by the likewise high etiologic fraction for house dust (66%), consisting mainly of mite allergens (VIRCHOW et al, 1976).

2. *To what extent do glucocorticosteroids influence the state of sensitisation of basophiles from horses with summer eczema (sweet itch) or COB?*

Due to clinical indications a total of 9 horses with summer eczema and 4 horses with COB were treated with different corticosteroids once or repeatedly:

- a) Prednisolone-21-acetate (i.m.; 2 horses with summer eczema)
- b) Prednisolone (oral; 3 horses with summer eczema because of acute bronchitis)
- c) Triamcinolone (i.m.; 4 horses with COB)
- d) Dexamethasone-21-acetate (local skin application; 4 horses with summer eczema)

Additionally the effects of Prednisolone-21-hydrogene succinate were tested in vitro on blood cells from a donor with summer eczema.

Immediately upon treatment with a sufficient amount of corticosteroids the histamine content in peripheral blood leukocytes was drastically decreased, accompanied by a significant reduction of basophiles (below 0.1%). Already under reduced doses of Prednisolone (given orally) and reliably upon stopping systemic administration of corticosteroids measurable, even overshooting amounts of histamine in peripheral blood cells returned in coincidence with an increase of basophiles. Interestingly, some of the horses showed a significantly altered pattern of sensitisation of their basophiles. Thus, treatment with corticosteroids might cause an "update" of basophiles with new surface-bound antibodies.

In contrast to those remarkable alterations in the reaction pattern and sensitisation of basophiles upon systemic application of corticosteroids, there was no detectable effect after topical skin treatment, nor upon exposure of equine basophiles in vitro with a wide concentration range of Prednisolone for 1-2 hours.

Several discordant results regarding allergen stimulation (FIT increases) and triggering by antiserum against equine immunoglobulins (FIT decreases) strongly suggested the presence of at least two different functional immunoglobulin-isotypes on the surface of equine basophiles.

3. *Is it possible to influence the degree of sensitisation of basophiles by treatment with Ökozon, Allergostop® I or Insol® Dermatophyton of horses with summer eczema?*

Due to the lack of reliable treatment regimes for horses suffering from summer eczema anecdotic success reports motivate horse owners to apply obscure treatments without any scientific background. A total of 20 horses with summer eczema were examined for treatment related changes in their degree of sensitisation: 8 of them were treated with Ökozon, 6 with Allergostop® I and another 6 with Insol® Dermatophyton. No reliable decrease in their "general" or their specific sensitisation against *Culicoides nubeculosus* could be found due to any of these treatments..