

# Allergiediagnostik beim Pferd: Vergleich intradermaler Hauttest und Funktionellen in vitro Test (FIT)

H. Leinemann, Korntal

R.E. Esch: GREER-Labs., Nuway Circle, N.E.,  
USA,

W.Leibold: Immunologie der TiHo Hannover

# Studienaufbau

- Doppelblindstudie
- Überprüfung intradermaler Hauttest (Ic)
- Überprüfung Funktioneller in vitro Test (FIT)
- Vergleich IC und FIT

# Klinik: Patientenpool

- Insect bite hypersensitivity Sommerexzem
- COPD Chronisch obstructive Lungenerkrankung

# Sommerekzem/ Insect bite hypersensitivity

- Intradermal skin tests in equine dermatology: a study of 83 horses Lebis, C. et al. 2002 Equine vet. J
- Intradermal skintesting in Icelandic horses in Austria Kolm-Stark G, Wagner R. 2002 Equine vet. J.
- Equine insect hypersensitivity: skin test and biopsy results correlated with clinical data 1990 Equine vet. J.

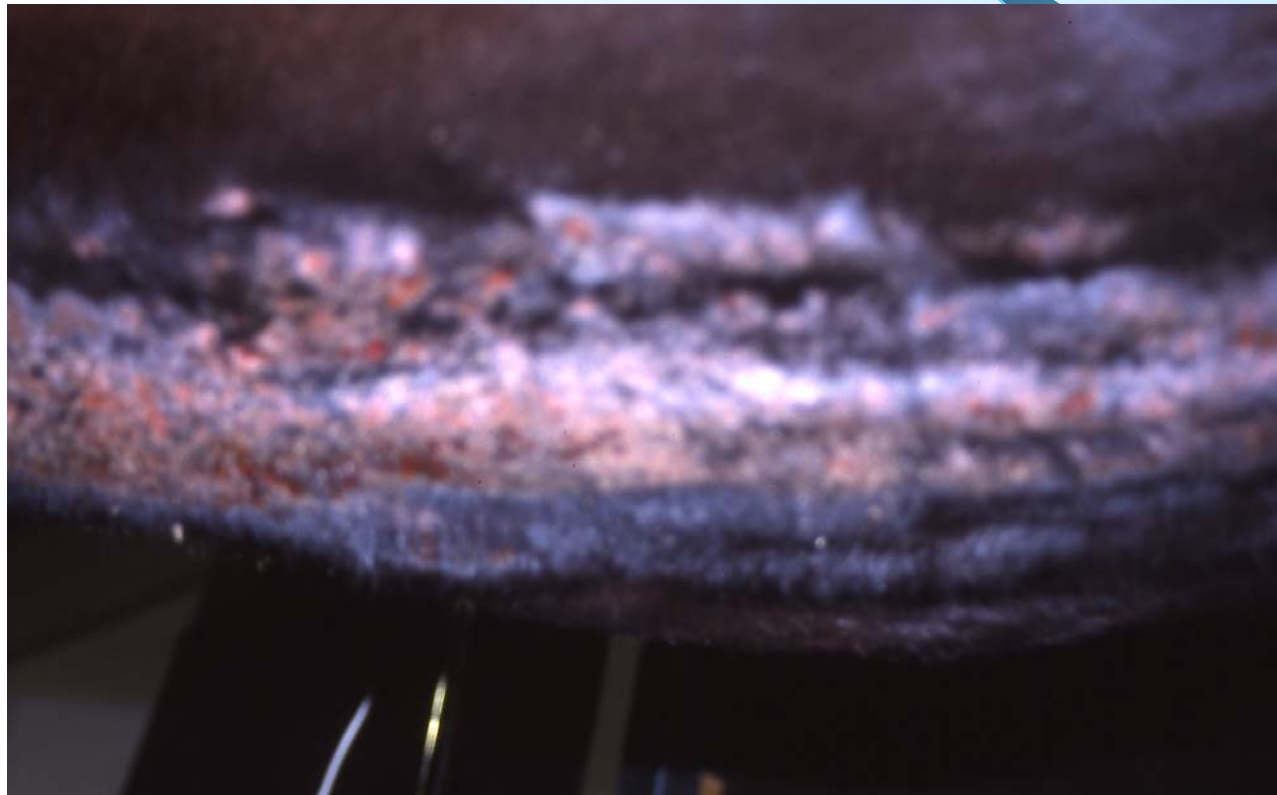
# Insect bite hypersensitivity

## Sommerekzem



# Insect bite hypersensitivity

## Sommerekzem







# Insect bite hypersensitivity Sommererekzem





# Immunologie

- FIT und Intradermaler Hauttest basieren auf dem Nachweis der Typ I allergischen Sensibilisierung beim Pferd
- IBH ist charakterisiert durch eine erhöhte Eigenschaft der B-Lymphozyten IgE zu produzieren
- Allergenspezifische IgE binden sich an entsprechende Rezeptoren an Mastzellen

# Chronisch-obstruktive Lungenerkrankung COPD

- Reversible/irreversible Bronchilakonstriktion
- Bedingt durch infektiöse Agenzien, inhalative Umweltantigene und chemisch-physikalische Reize
- Allergene: Pilzsporen, Pollen, Milben, Stroh-und Heustaub

# COPD



# COPD



# Versuchsaufbau

- Anamnese
- Alter
- Geschlecht
- Rasse
- Untersuchungszeitraum
- Kleines Blutbild
- 3 Wochen vorher keine Therapie mit Medikamenten



# Patientenpool

- 16 Pferde: Juli bis September
- 12 Sommererkzem 4 COPD
- Alter zwischen 4 und 16 Jahren
- 12 Wallache 4 Stuten
- 10 Warmblüter 2 Quarter 4 Isländer
- 5 Pferde Wiederholungstest im Dezember

# Intradermaler Hauttest

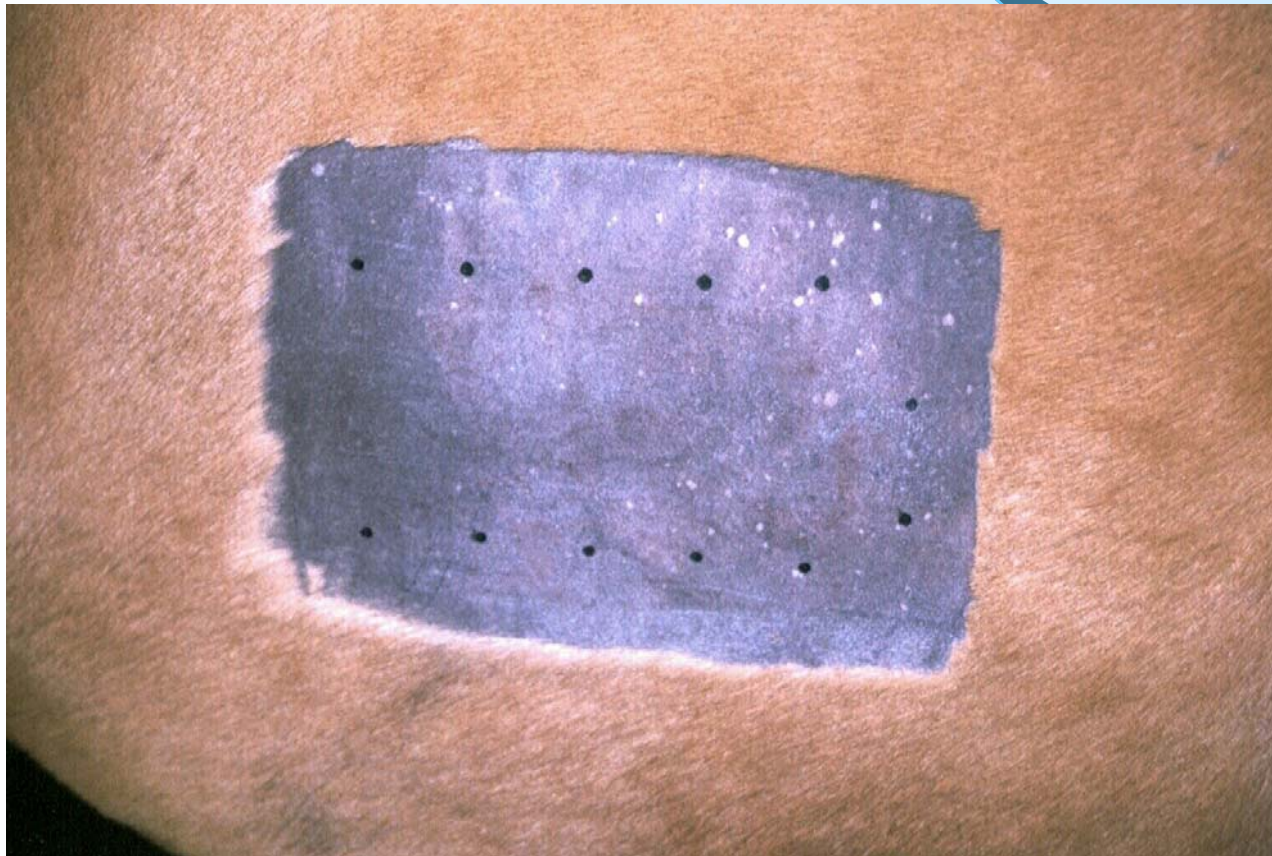
- Freischeren der rechten Brustwand und Markierung von 20 Injektionsstellen
- Injektion von 100  $\mu$ l intradermal von 20 Allergenen
- Allergopharm Negativ NaCl (0,9%) Kontrolle und Positiv Histaminkontrolle (1 + 9999)

# Intradermaler Hauttest

## Allergene

- Dermatophagoides farinae (0,05;0,5; 5; 50 µg/ml)
- Dermatophagoides pteronyssinus (0,05; 0,5; 5; 50 µg/ml))
- 2 x Culicoides nubeculosus (0,05;0,5;5;15 µg/ml)  
Sommer
- 2 x Tabanus spp. (0,05;0,5;5;50 µg/ml) Winter bei  
5 Kontrolltieren

# Intradermaler Hauttest

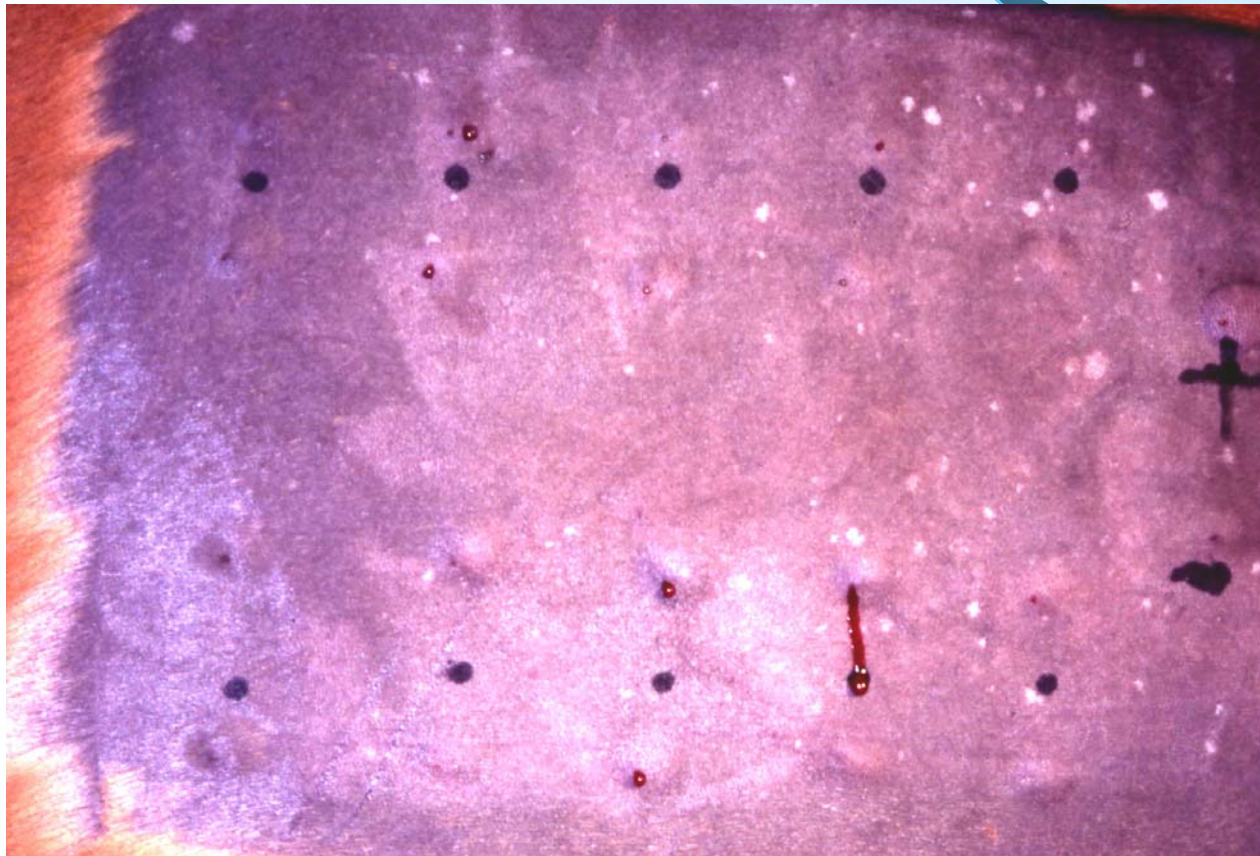


# Intradermaler Hauttest Injektion





# Intradermaler Hauttest Blutung



# Intradermaler Hauttest

- Ablesen der Injektionen nach 15 und 30 Minuten Beurteilung nach Größe und Infiltration
- Positiv  $>$  Mittelwert Histamin + NaCl 15 + 30 min
- Negativ  $<$  Mittelwert Histamin + NaCl 15 + 30 min

# Ablesung Positivkontrolle



Positiv 14 (15min)  
18 (30 min)

Negativ 5 (15 min)  
3 (30 min)

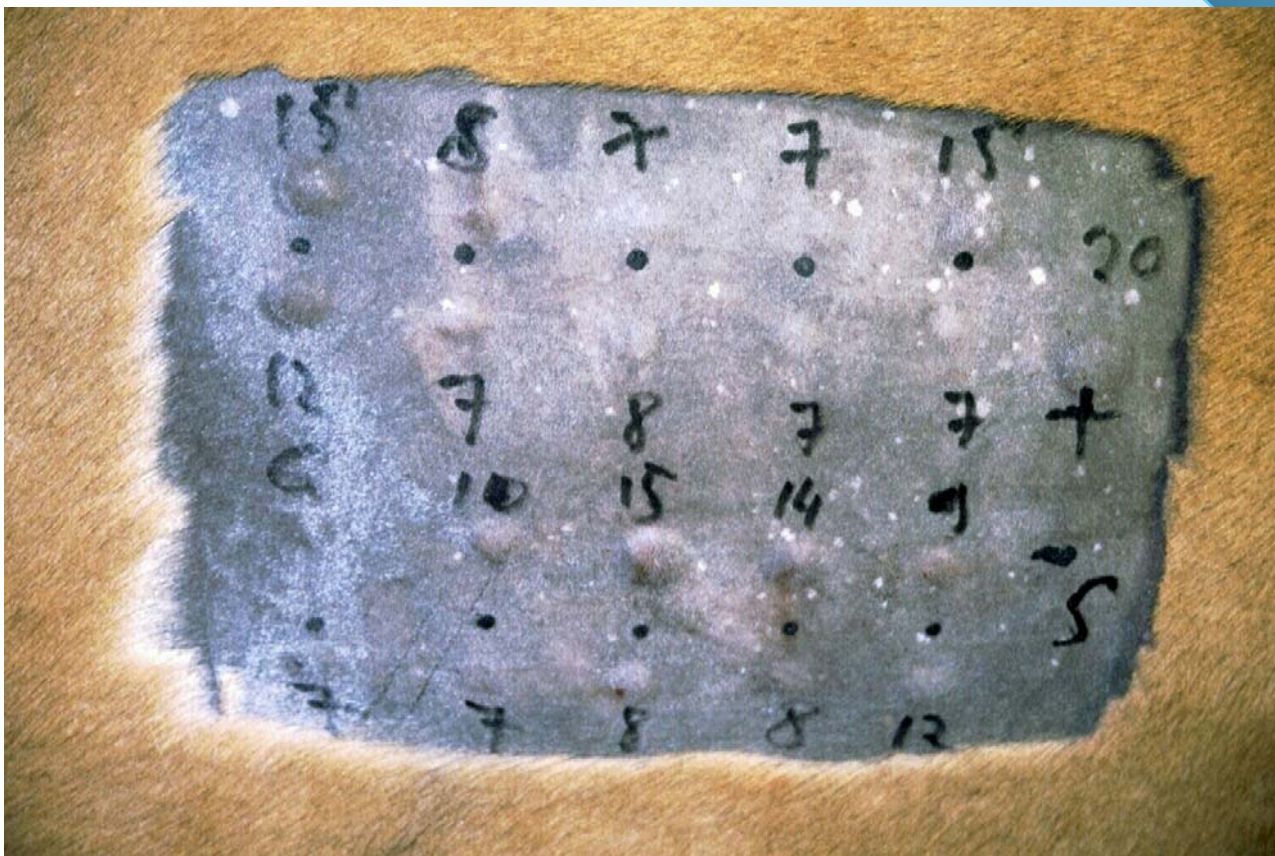
Mittelwert 10



# Intradermaler Hauttest Einzelergebnisse



# Intradermaler Hauttest





# Untersuchungsablauf und Bewertung des funktionellen in-vitro Tests (FIT)

## Untersuchungsablauf:

EDTA-Blut (max. 24 Std. alt)

Waschen der Zellen zur Entfernung nicht zellgebundener Antikörper und anderer zellfreier Substanzen

Exposition der Zellen in geeignetem Puffermilieu mit zu prüfenden Allergenpräparationen (meist in 4 Konzentrationen)

Parallele Kontrollen zur Prüfung der Zellqualität und der Zellreaktionsfähigkeit

Isolierung zellfreier Überstände von allen Test- und Kontrollansätzen

Zur selektiven Ermittlung der Reaktion basophiler Granulozyten in der Blutprobe erfolgt die quantitative Bestimmung des Histamingehaltes in den Überständen, bezogen auf die ursprüngliche Blutmenge

## Bewertung:

Sie erfolgt nur, wenn die Kontrollen eine einwandfreie Reaktionsfähigkeit der Zellen anzeigen !

- Geringe Spontanfreisetzung an Histamin
- Dosisabhängige Histaminfreisetzung bei den Positivkontrollen

Relativ zu einer geeigneten positiven Kontrolle einer jeden Blutprobe wird die prozentuale Histaminfreisetzung aller anderen Ansätze dieser Blutprobe ermittelt

Je Allergen & Konzentration wird ermittelt, ob eine positive (> 10 %) oder eine negative (< 10 %) Reaktion der basophilen Granulozyten vorliegt

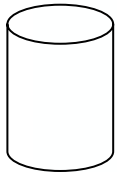
Je Allergenpräparation wird nun ermittelt, mit welcher Konzentration die Zellen positiv reagiert haben:

### Reaktionsstärken

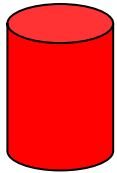
- 0: keine positive Testreaktion
- 1: pos. Rkt. nur auf die höchste Konz.
- 2: pos. Rkt. auf die ersten 2 Konz.
- 3: pos. Rkt. auf die ersten 3 Konz
- 4: pos. Rkt. auf alle 4 Konzentrationen

# Schematische Darstellung des funktionellen in-vitro Tests (FIT)

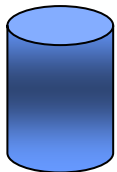
## Kontrollen:



**Spontanfreisetzung:** Zellen + Puffer: 37 °C

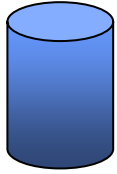


**Physikal. Freisetzung:** Zellen + Puffer: 100 °C

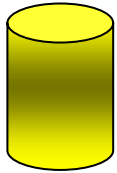


**Antikörpervermittelte Freisetzung:**

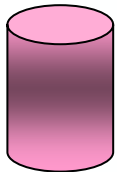
- Zellen + Anti-Isotyp 1: hohe Konzentration



- Zellen + Anti-Isotyp 1: niedere Konz.

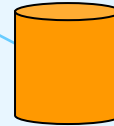


- Zellen + Anti-Isotyp 2

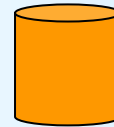


- Zellen + Anti-Isotyp 3

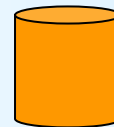
## Testansätze:



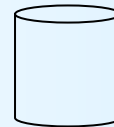
Allergen A: 15 µg/ml



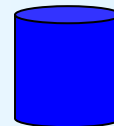
Allergen A: 5 µg/ml



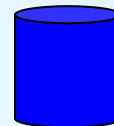
Allergen A: 0,5 µg/ml



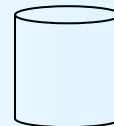
Allergen A: 0,05 µg/ml



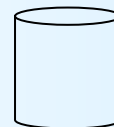
Allergen B: 50 µg/ml



Allergen B: 5 µg/ml



Allergen B: 0,5 µg/ml



Allergen B: 0,05 µg/ml

## Ergebnisbeispiele:

**24 %** von der Maximalfreisetzg.  
Positiv, da > 10 %

9 % = negativ, da < 10 %

7 % = negativ, da < 10 %

6 % = negativ, da < 10 %

**Bewertung für Allergen A = 1**

**98 %** von der Maximalfreisetzg.  
Positiv, da > 10 %

**73 %**

**49 %**

**16 %**

**Bewertung für Allergen B = 4**

## 2 Beispiele für die Detailauswertung des intradermalen Hauttestes

| Code<br>Nr. | Hautdicke |         |      |    |     | Bewertung |         |      |    |     | Konzentr. | Allergene |         |
|-------------|-----------|---------|------|----|-----|-----------|---------|------|----|-----|-----------|-----------|---------|
|             | Nach      |         | 10,5 | Ic | FIT | nach      |         | 11   | Ic | FIT |           |           |         |
|             | 15 Min.   | 30 Min. | MW   |    |     | 15 Min.   | 30 Min. | MW   |    |     |           |           |         |
| 1           | 12        | 15      | 14   | 1  | 1   | 10        | 14      | 12   | 1  | 1   | 15        | µg/ml     | Cn 1    |
| 2           | 15        | 17      | 16   | 1  | 1   | 11        | 10      | 10,5 | 0  | 1   | 5         | µg/ml     | Cn 1    |
| 3           | 5         | 7       | 6    | 0  | 1   | 8         | 10      | 9    | 0  | 1   | 0,5       | µg/ml     | Cn 1    |
| 4           | 8         | 7       | 8    | 0  | 0   | 8         | 8       | 8    | 0  | 0   | 0,05      | µg/ml     | Cn 1    |
| 5           | 11        | 14      | 13   | 1  | 1   | 9         | 10      | 10   | 0  | 1   | 50        | µg/ml     | D.far.  |
| 6           | 12        | 15      | 14   | 1  | 1   | 10        | 15      | 13   | 1  | 1   | 5         | µg/ml     | D.far.  |
| 7           | 5         | 7       | 6    | 0  | 1   | 8         | 10      | 9    | 0  | 1   | 0,5       | µg/ml     | D.far.  |
| 8           | 5         | 7       | 6    | 0  | 0   | 8         | 7       | 8    | 0  | 1   | 0,05      | µg/ml     | D.far.  |
| 13          | 13        | 15      | 14   | 1  | 1   | 8         | 11      | 10   | 0  | 1   | 50        | µg/ml     | D.pter. |
| 14          | 8         | 10      | 9    | 0  | 1   | 9         | 10      | 10   | 0  | 1   | 5         | µg/ml     | D.pter. |
| 15          | 7         | 7       | 7    | 0  | 0   | 8         | 10      | 9    | 0  | 1   | 0,5       | µg/ml     | D.pter. |
| 16          | 6         | 7       | 7    | 0  | 0   | 7         | 5       | 6    | 0  | 0   | 0,05      | µg/ml     | D.pter. |
| 17          | 6         | 6       | 6    | 0  | 0   | 5         | -       | 5    | 0  | 0   | 0,05      | µg/ml     | Cn 2    |
| 18          | 5         | 7       | 6    | 0  | 1   | 5         | 5       | 5    | 0  | 0   | 0,5       | µg/ml     | Cn 2    |
| 19          | 11        | 11      | 11   | 1  | 1   | 7         | 10      | 9    | 0  | 1   | 5         | µg/ml     | Cn 2    |
| 20          | 14        | 15      | 15   | 1  | 1   | 7         | 10      | 9    | 0  | 1   | 15        | µg/ml     | Cn 2    |

Tier # 15

Tier # 16

# Hauttest - Fit - Vergleich

Tiere: 1 - 16

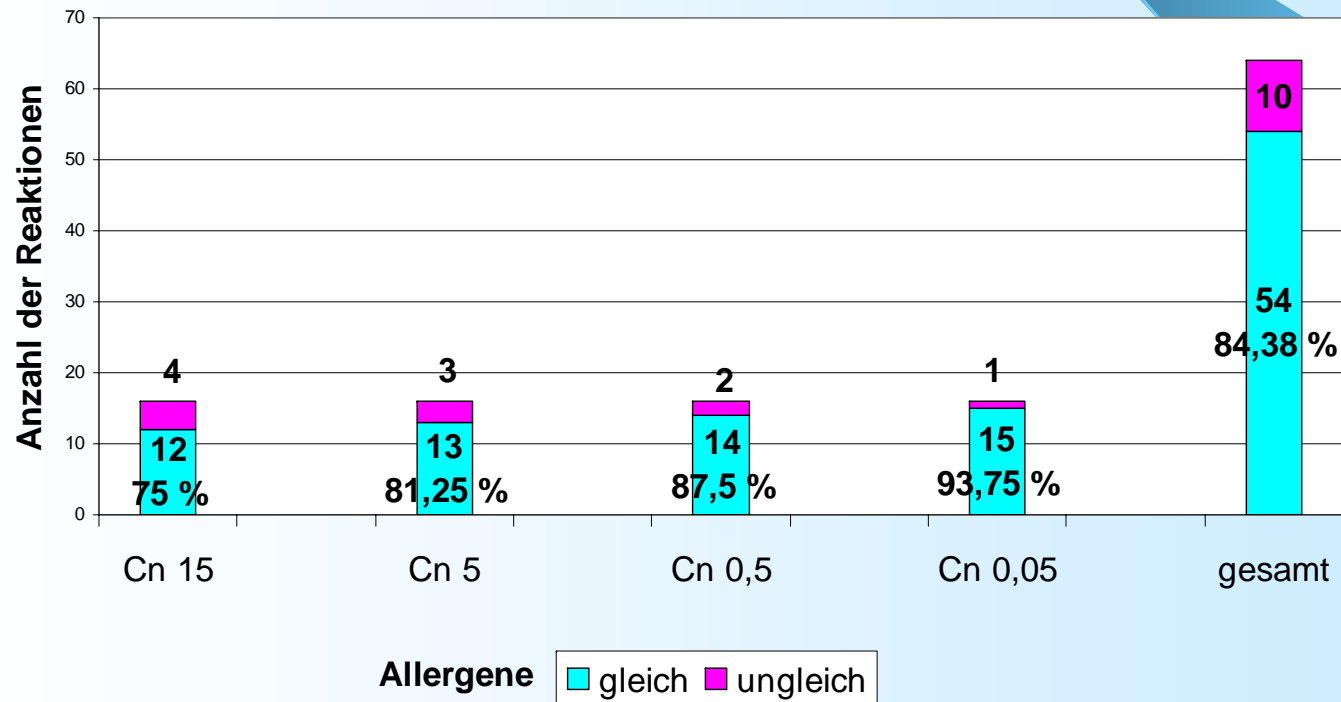
07.09.2001

|        |      |       | Pferd Nr.   | 1  | 2   | 3  | 4    | 5  | 6   | 7  | 8    |    |     |    |      |    |     |    |      |
|--------|------|-------|-------------|----|-----|----|------|----|-----|----|------|----|-----|----|------|----|-----|----|------|
|        |      |       | Hauptsympt. |    |     |    |      |    |     |    |      |    |     |    |      |    |     |    |      |
|        |      |       | Ergebnis    | IC | FIT | IC | FIT  | IC | FIT | IC | FIT  | IC | FIT | IC | FIT  | IC | FIT | IC | FIT  |
|        |      |       | MR          |    | 54  |    | 26,8 |    | 35  |    | 28,4 |    | 10  |    | 31,3 |    | 41  |    | 12,9 |
| i.c.   |      |       | neg. Kontr. |    |     |    |      |    |     |    |      |    |     |    |      |    |     |    |      |
|        |      |       | pos. Kontr. |    |     |    |      |    |     |    |      |    |     |    |      |    |     |    |      |
|        |      |       | Allergen    |    |     |    |      |    |     |    |      |    |     |    |      |    |     |    |      |
| Cn     | 15   | µg/ml | <b>1</b>    | 0  | 1   | 1  | 1    | 0  | 1   | 0  | 0    | 0  | 1   | 1  | 1    | 1  | 0   | 0  | 0    |
| Cn     | 5    | µg/ml | <b>2</b>    | 0  | 1   | 0  | 1    | 0  | 1   | 0  | 0    | 0  | 0   | 1  | 1    | 1  | 1   | 0  | 0    |
| Cn     | 0,5  | µg/ml | <b>3</b>    | 0  | 1   | 0  | 1    | 0  | 1   | 0  | 0    | 0  | 0   | 0  | 1    | 0  | 1   | 0  | 0    |
| Cn     | 0,05 | µg/ml | <b>4</b>    | 0  | 0   | 0  | 1    | 0  | 0   | 0  | 0    | 0  | 0   | 0  | 0    | 0  | 1   | 0  | 0    |
| D.far. | 50   | µg/ml | <b>5</b>    | 1  | 0   | 0  | 0    | 1  | 0   | 0  | 0    | 1  | 1   | 0  | 0    | 0  | 1   | 0  | 0    |
| D.far. | 5    | µg/ml | <b>6</b>    | 0  | 0   | 0  | 0    | 1  | 0   | 0  | 0    | 0  | 1   | 1  | 0    | 0  | 1   | 0  | 0    |
| D.far. | 0,5  | µg/ml | <b>7</b>    | 0  | 0   | 0  | 0    | 1  | 0   | 0  | 0    | 0  | 0   | 0  | 0    | 0  | 1   | 0  | 0    |
| D.far. | 0,05 | µg/ml | <b>8</b>    | 0  | 0   | 0  | 0    | 0  | 0   | 0  | 0    | 0  | 0   | 0  | 0    | 0  | 0   | 0  | 0    |
| D.pt   | 50   | µg/ml | <b>9</b>    | 0  | 1   | 0  | 1    | 1  | 1   | 0  | 0    | 1  | 0   | 1  | 0    | 1  | 1   | 0  | 0    |
| D.pt   | 5    | µg/ml | <b>10</b>   | 0  | 0   | 0  | 0    | 1  | 0   | 0  | 0    | 1  | 0   | 1  | 0    | 1  | 1   | 0  | 0    |
| D.pt   | 0,5  | µg/ml | <b>11</b>   | 0  | 0   | 0  | 0    | 1  | 0   | 0  | 0    | 0  | 0   | 1  | 0    | 0  | 1   | 0  | 0    |
| D.pt   | 0,05 | µg/ml | <b>12</b>   | 0  | 0   | 0  | 0    | 0  | 0   | 0  | 0    | 0  | 0   | 0  | 0    | 0  | 0   | 0  | 0    |
| Cn     | 0,05 | µg/ml | <b>13</b>   | 0  | 0   | 0  | 1    | 0  | 0   | 0  | 0    | 0  | 0   | 0  | 0    | 0  | 1   | 0  | 0    |
| Cn     | 0,5  | µg/ml | <b>14</b>   | 0  | 1   | 0  | 1    | 0  | 1   | 0  | 0    | 0  | 0   | 0  | 1    | 0  | 1   | 0  | 0    |
| Cn     | 5    | µg/ml | <b>15</b>   | 1  | 1   | 1  | 1    | 0  | 1   | 0  | 0    | 0  | 0   | 0  | 1    | 1  | 1   | 0  | 0    |
| Cn     | 15   | µg/ml | <b>16</b>   | 1  | 1   | 1  | 1    | 1  | 1   | 0  | 0    | 0  | 1   | 0  | 1    | 1  | 1   | 0  | 0    |

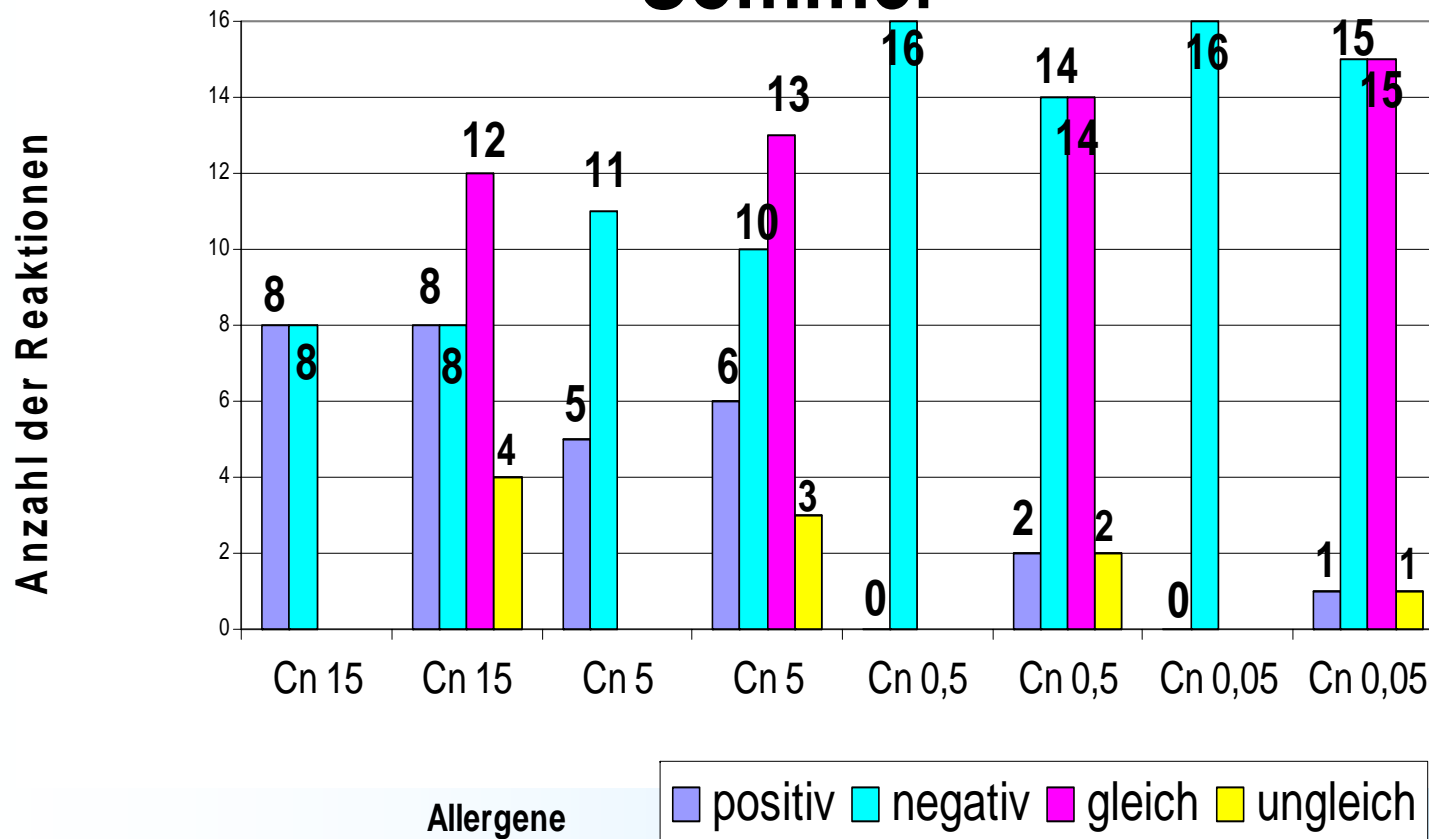




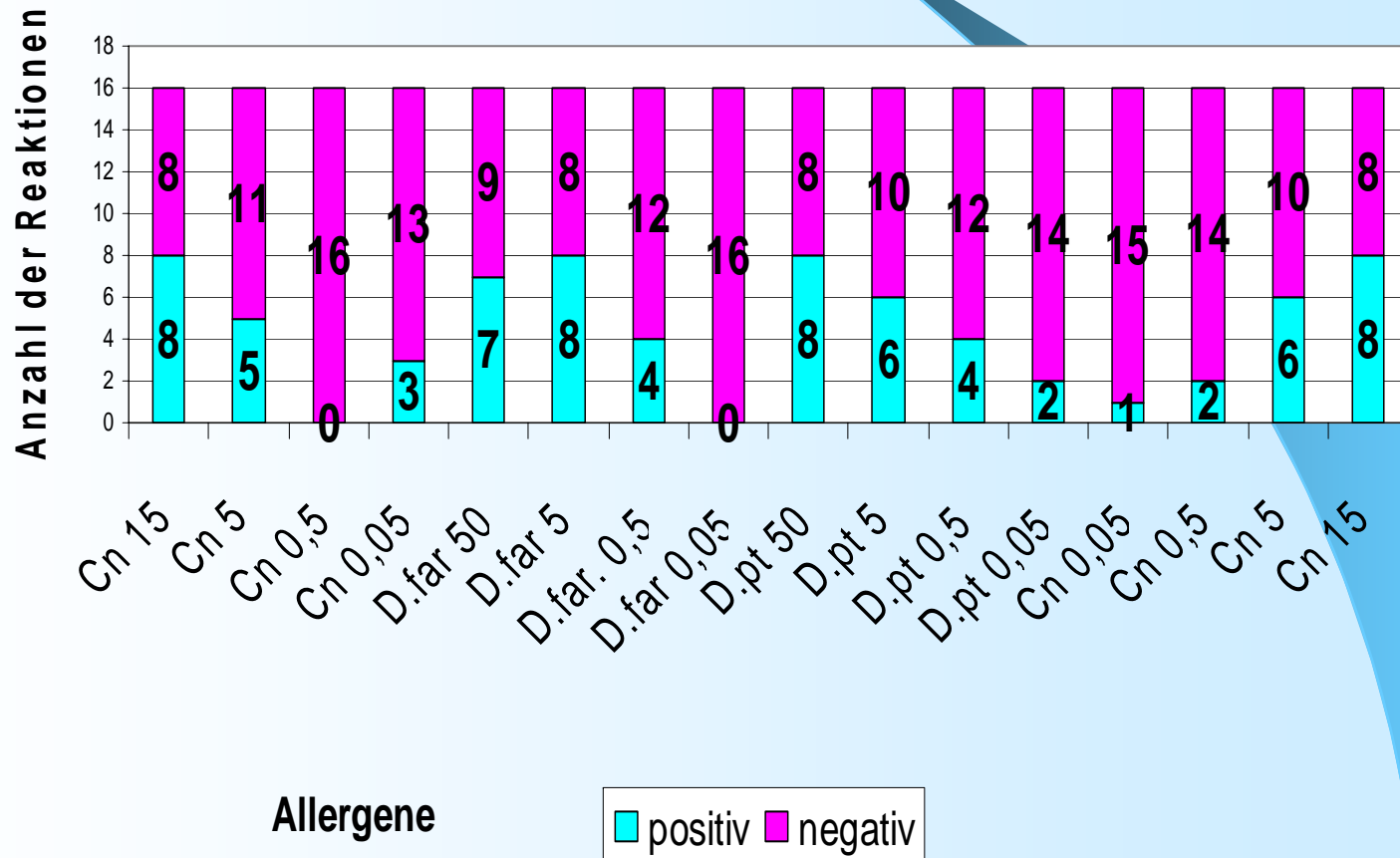
# Intradermaler Hauttest am gleichen Tier für Culicoides Sommer



# Intradermaler Hauttest am gleichen Tier für Culicoides Sommer

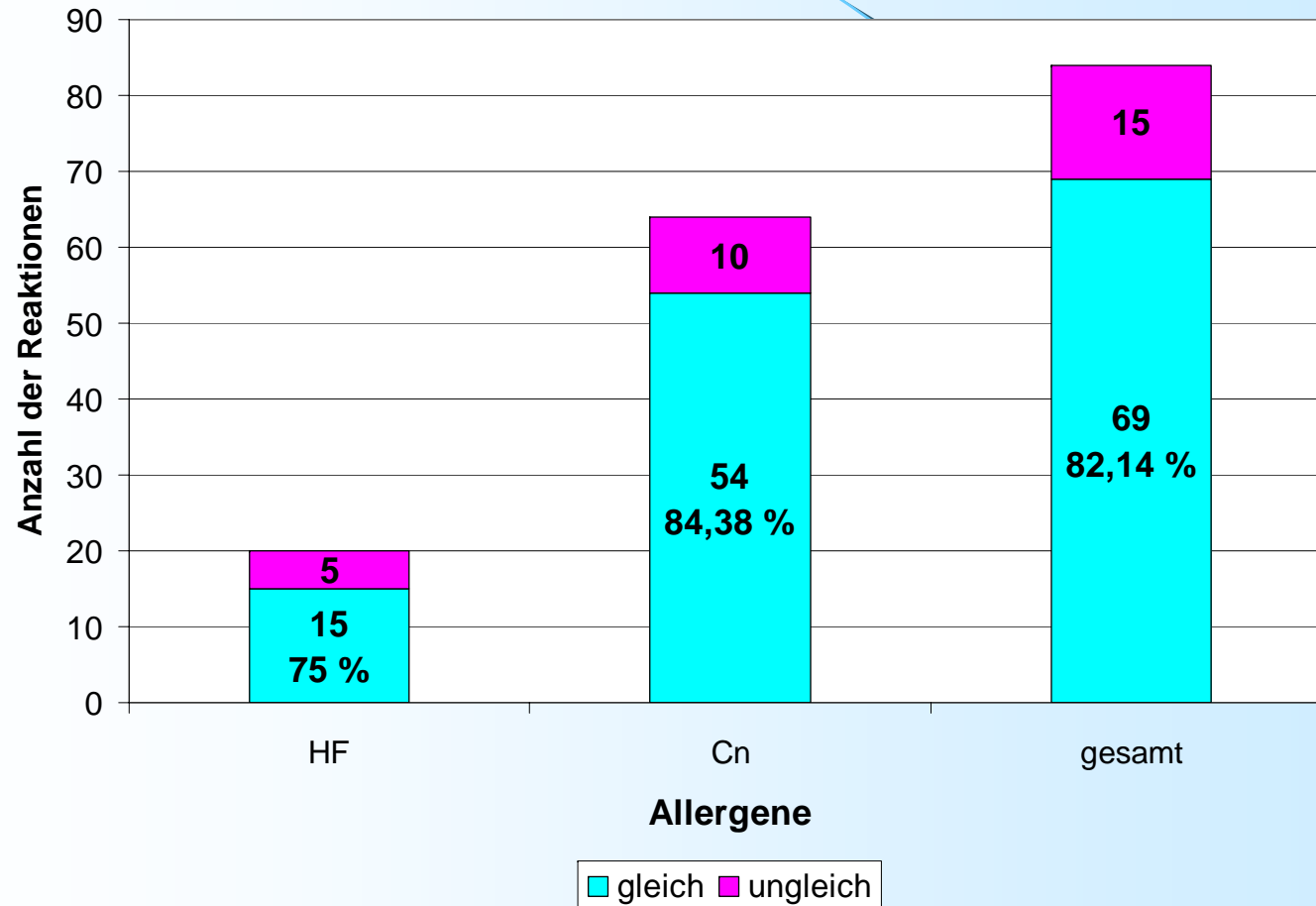


# Intradermaler Hauttest nach Konzentrationen Sommer

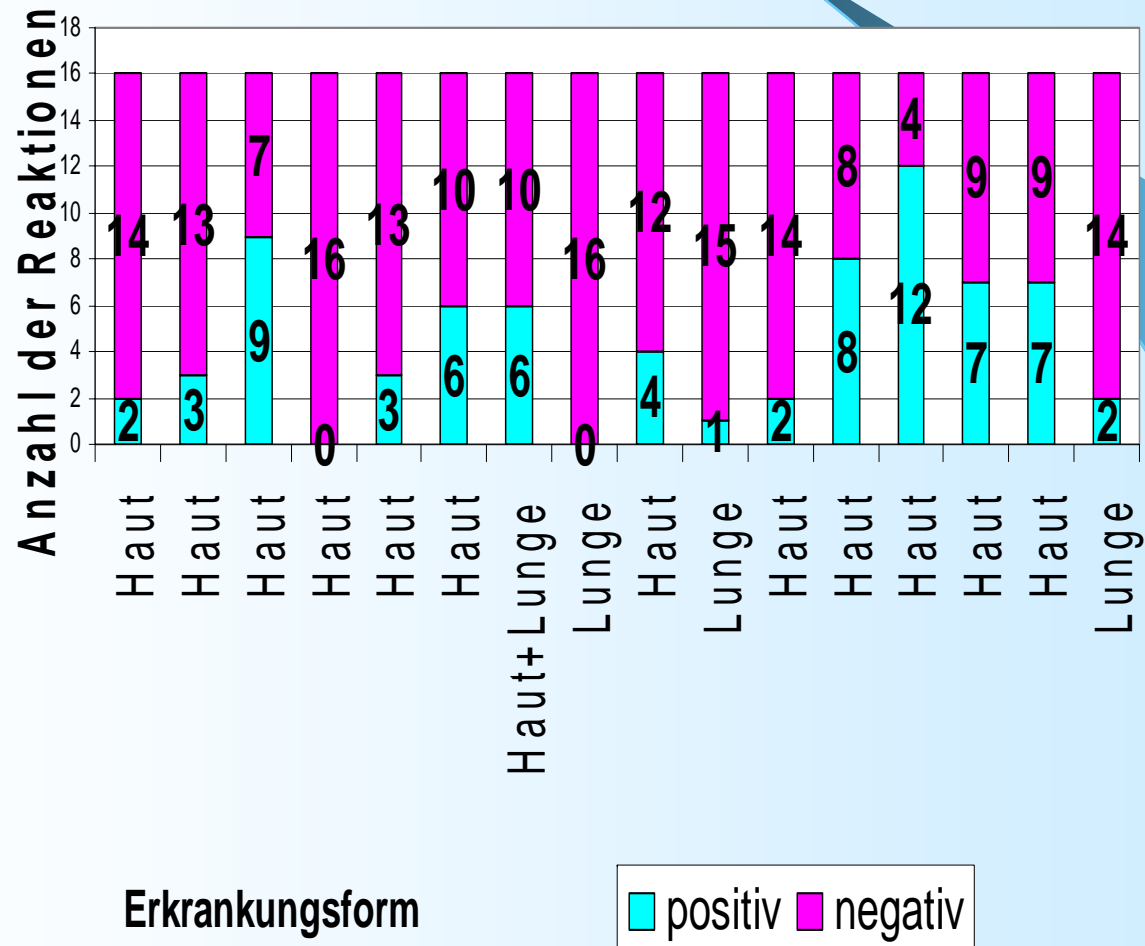




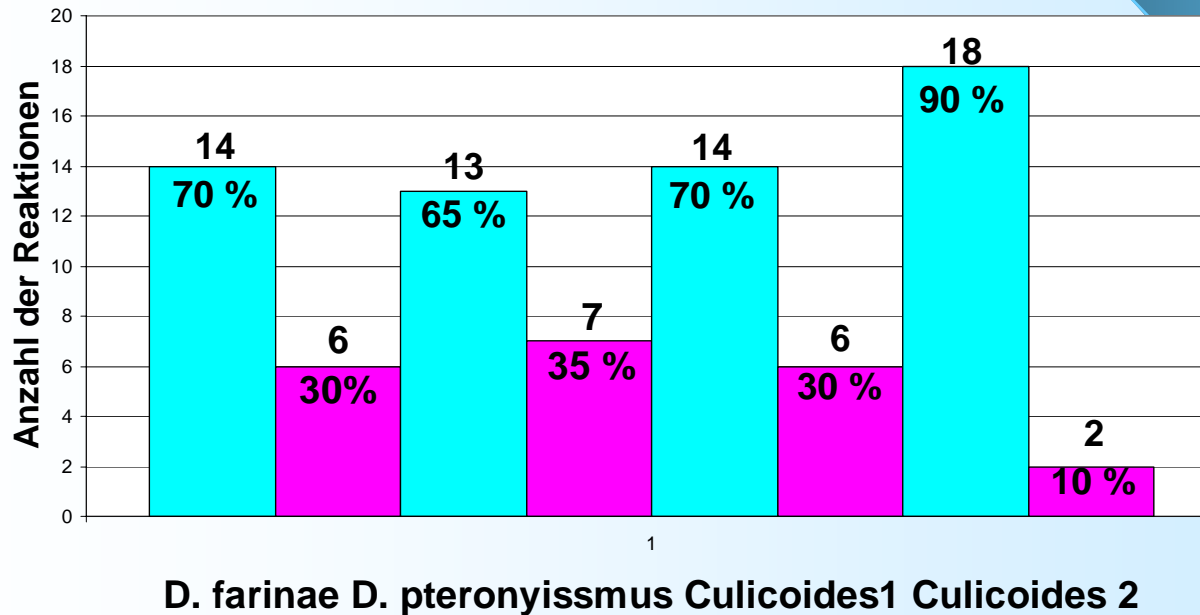
# Intradermaler Hauttest für Taban.spp. und Culicoides nub.



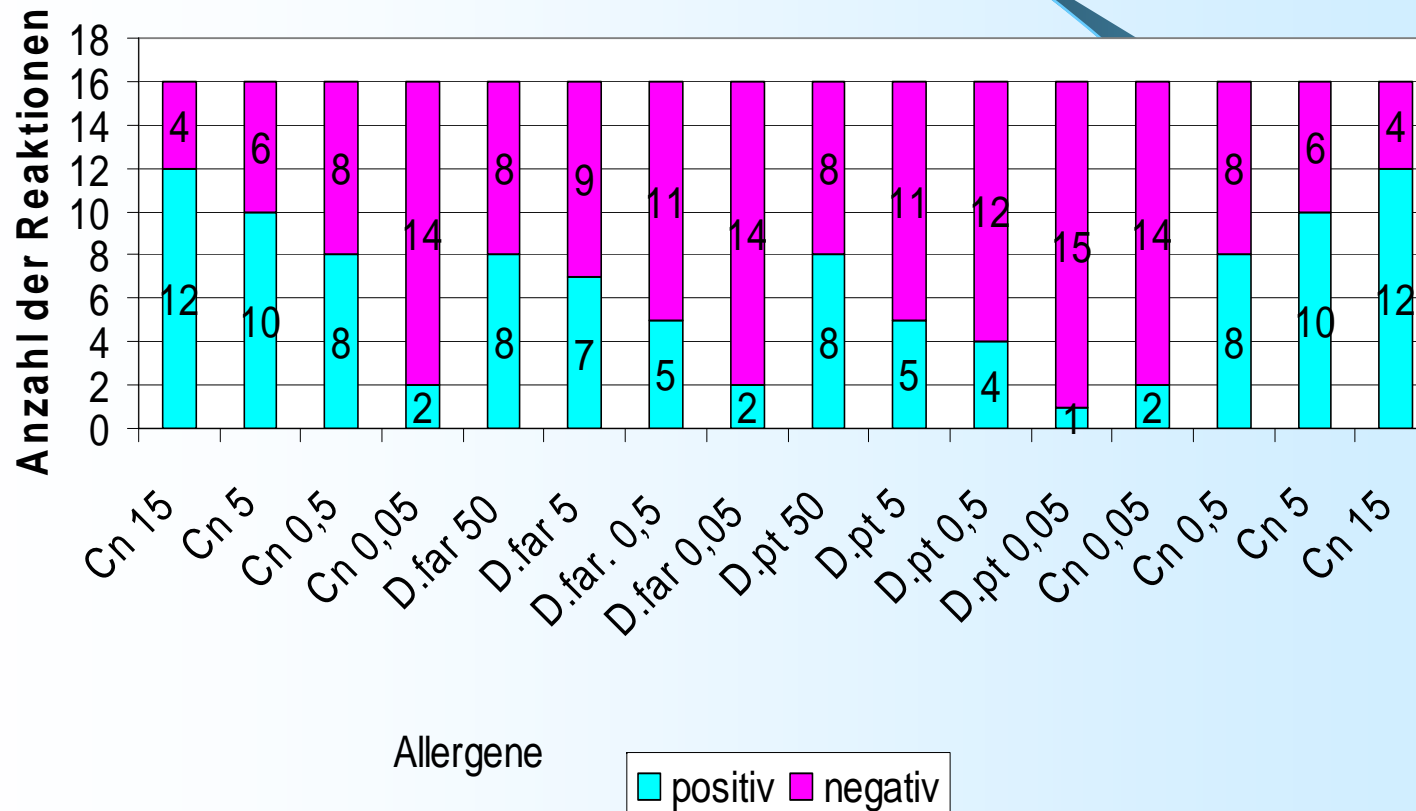
# Intradermaler Hauttest nach Erkrankungsform Sommer



# Intradermaler Hauttest nach Allergengruppen Sommer-Winter

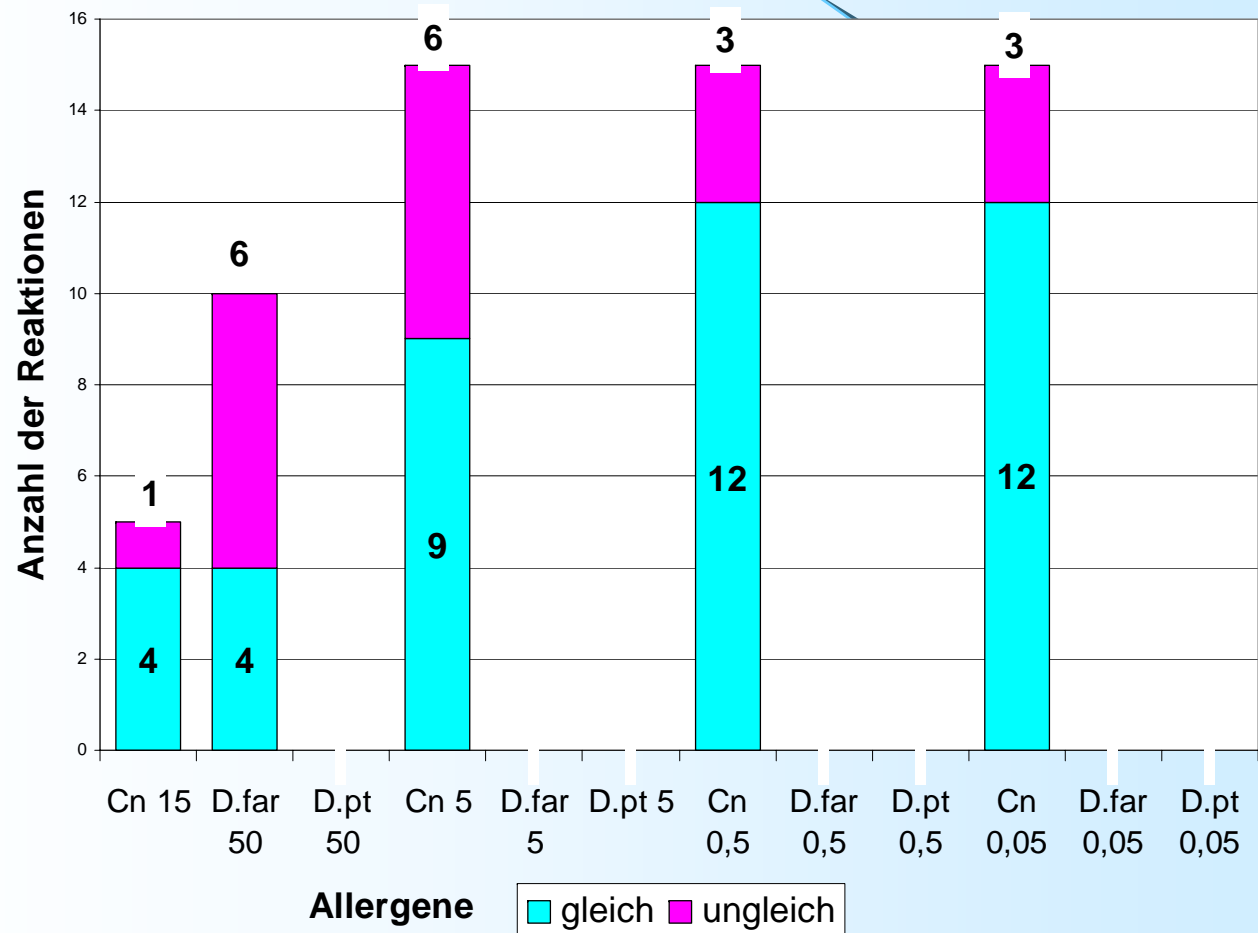


# FIT nach Konzentrationen Sommer

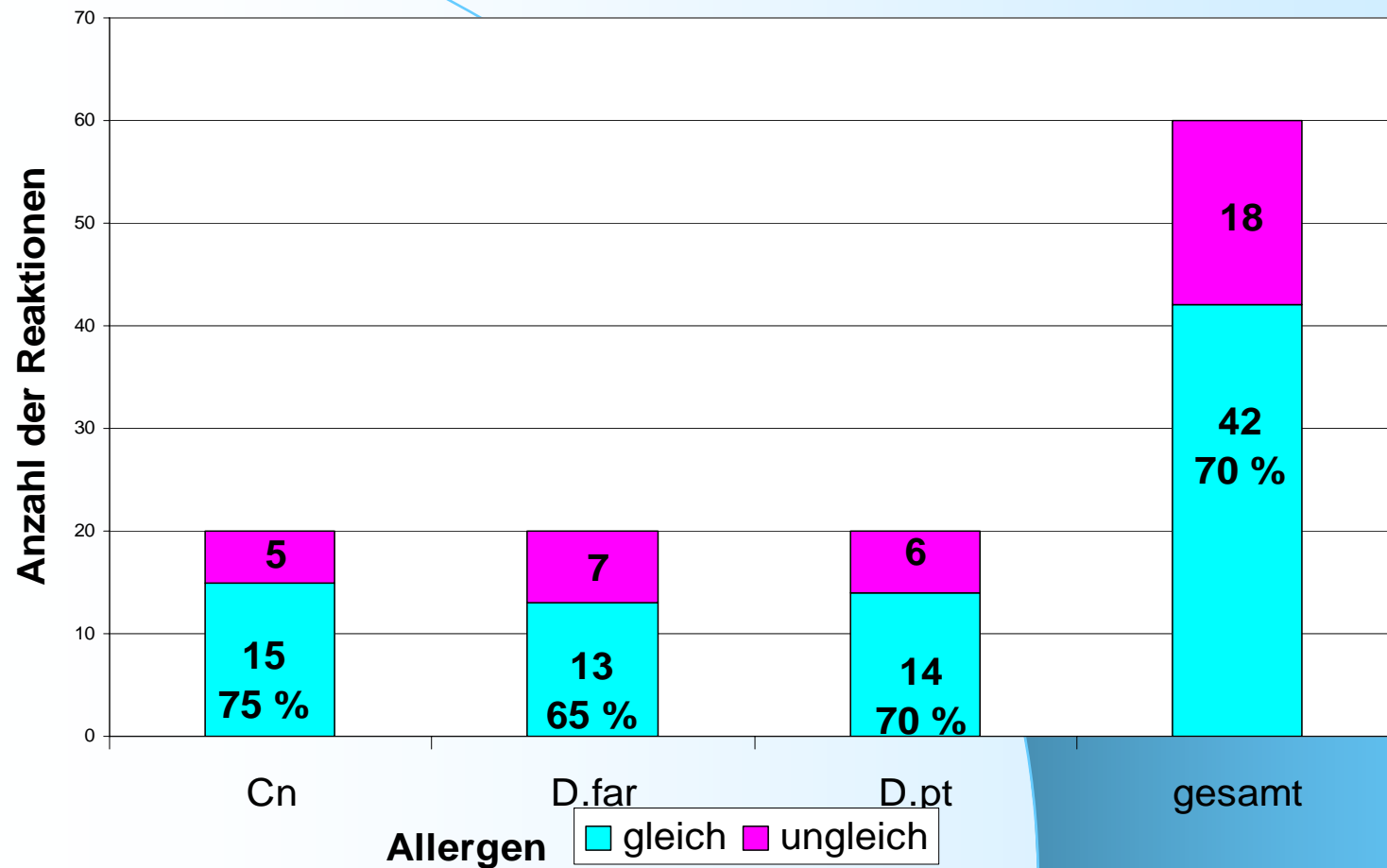




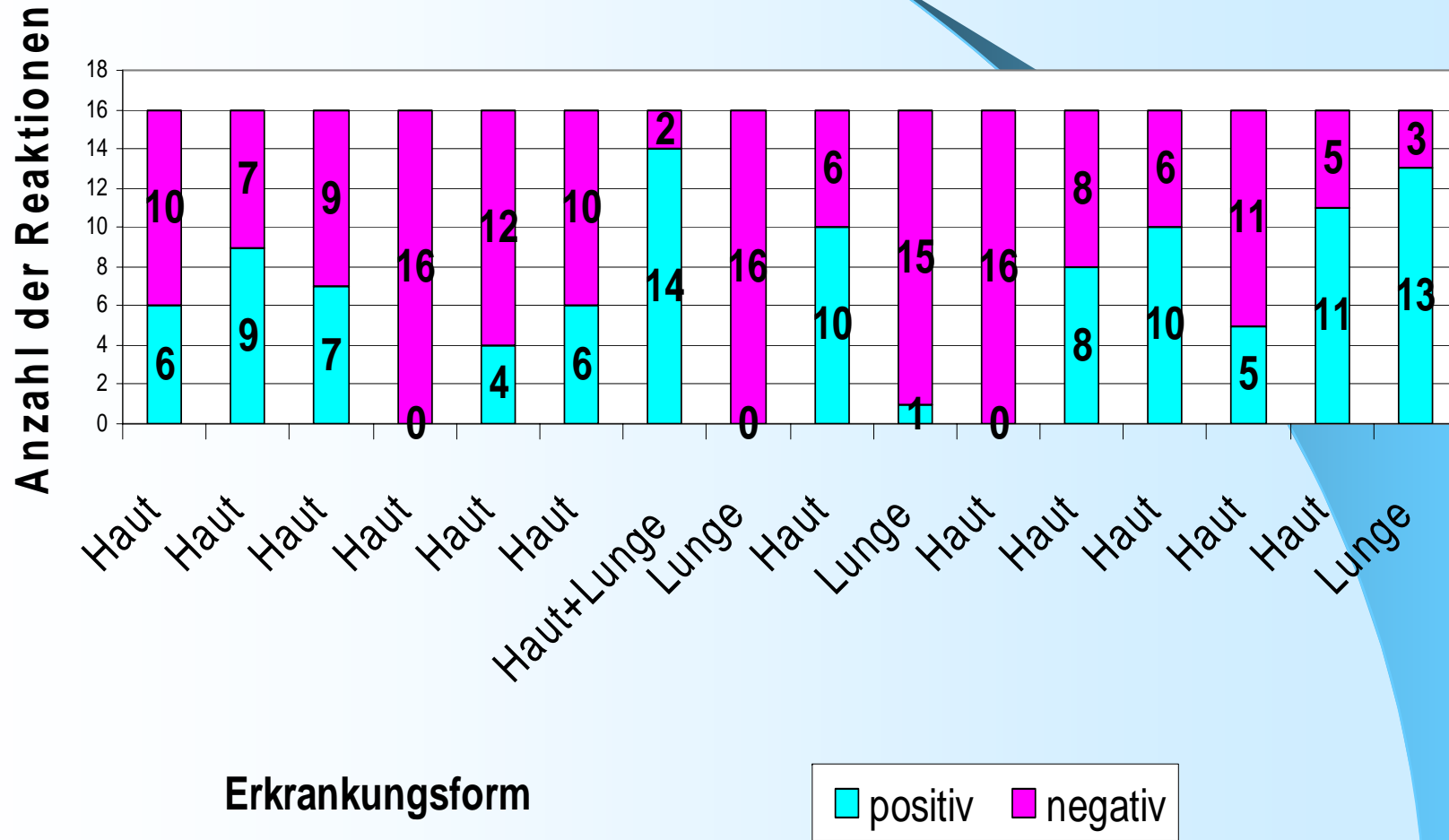
# FIT nach Konzentrationen Sommer - Winter



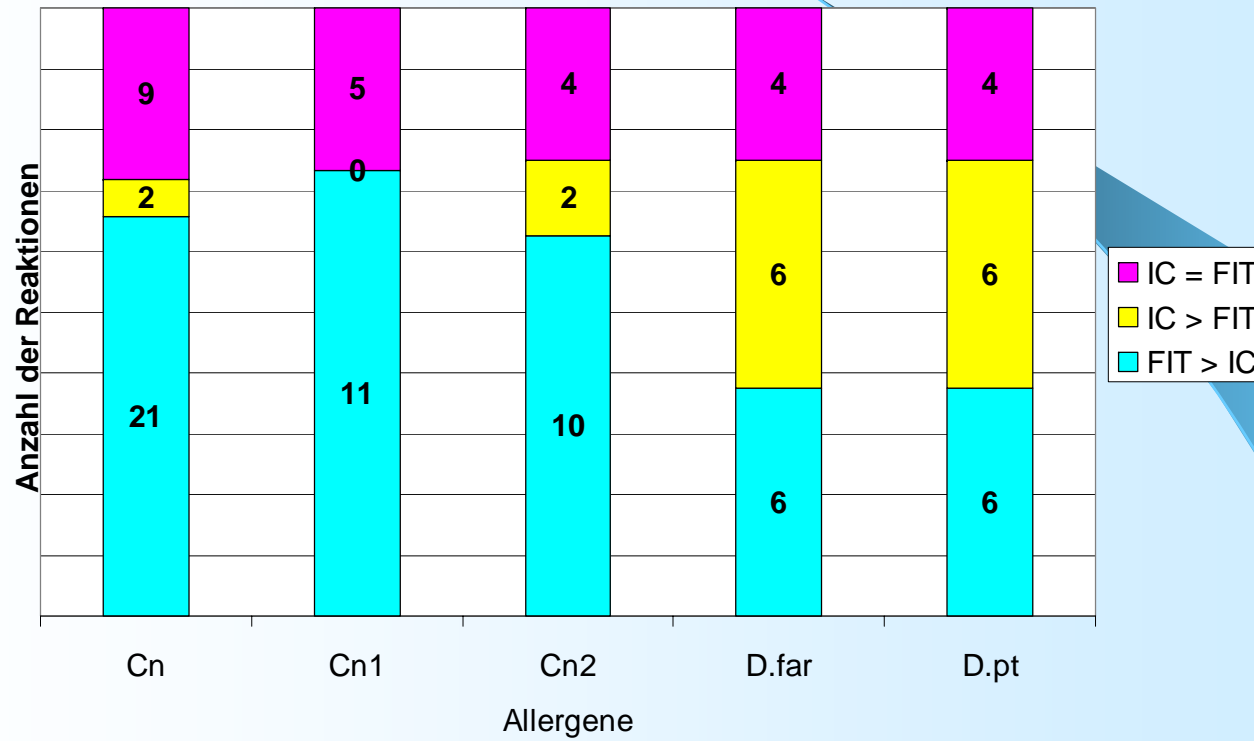
# FIT nach Allergenstämmen Sommer-Winter



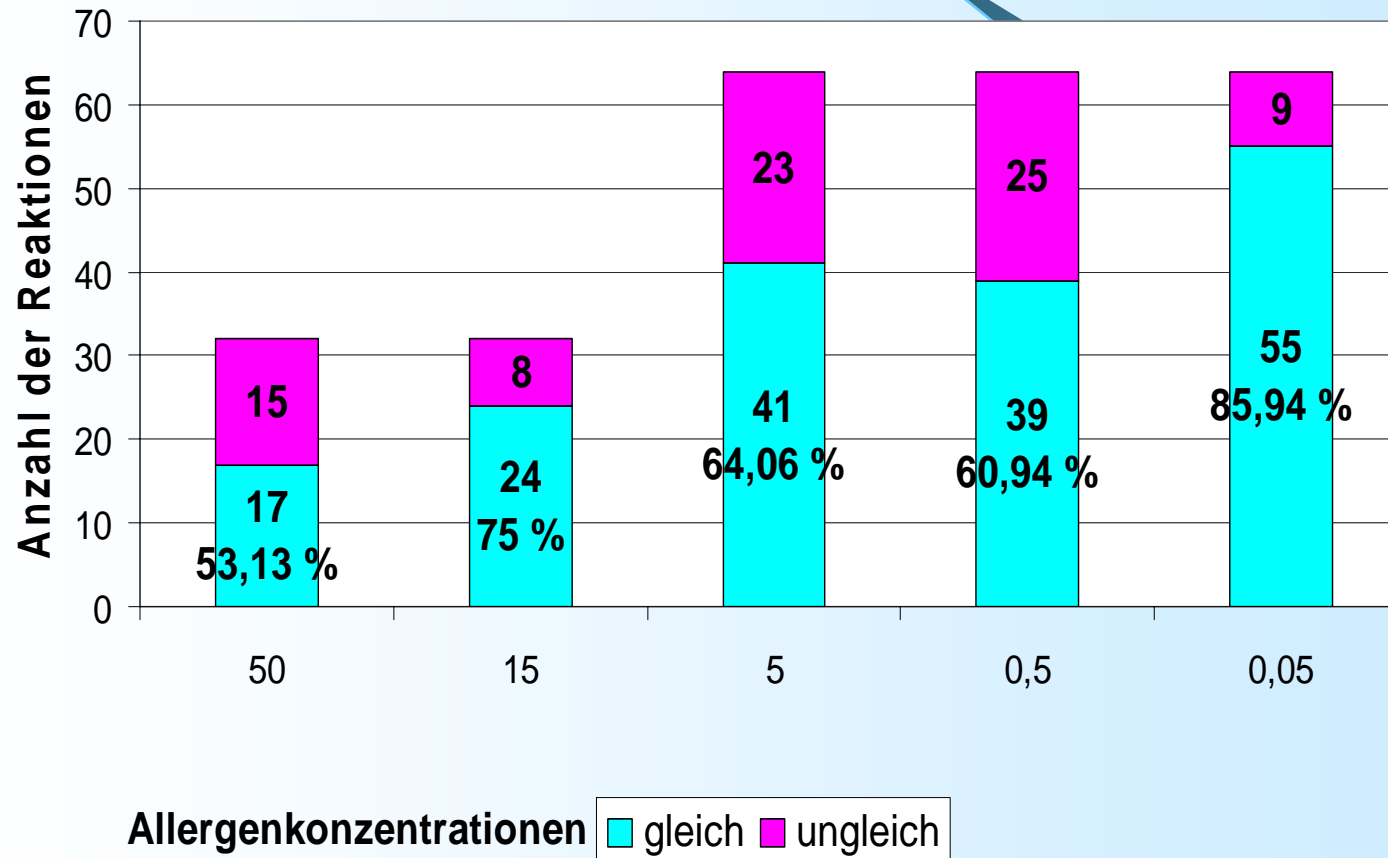
# FIT nach Erkrankungsform Sommer



# Übereinstimmung FIT - intradermaler Hauttest Sommer

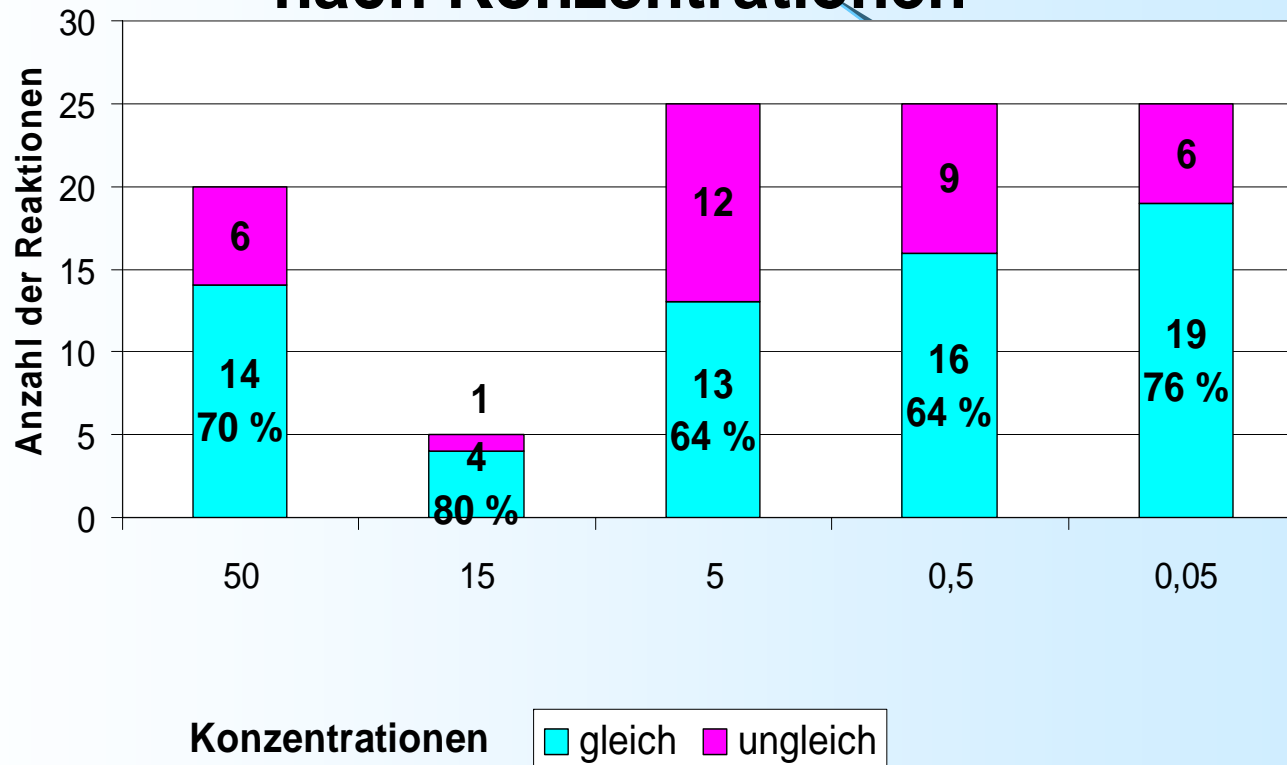


# Übereinstimmung FIT - intradermaler Hauttest Sommer nach Konzentrationen

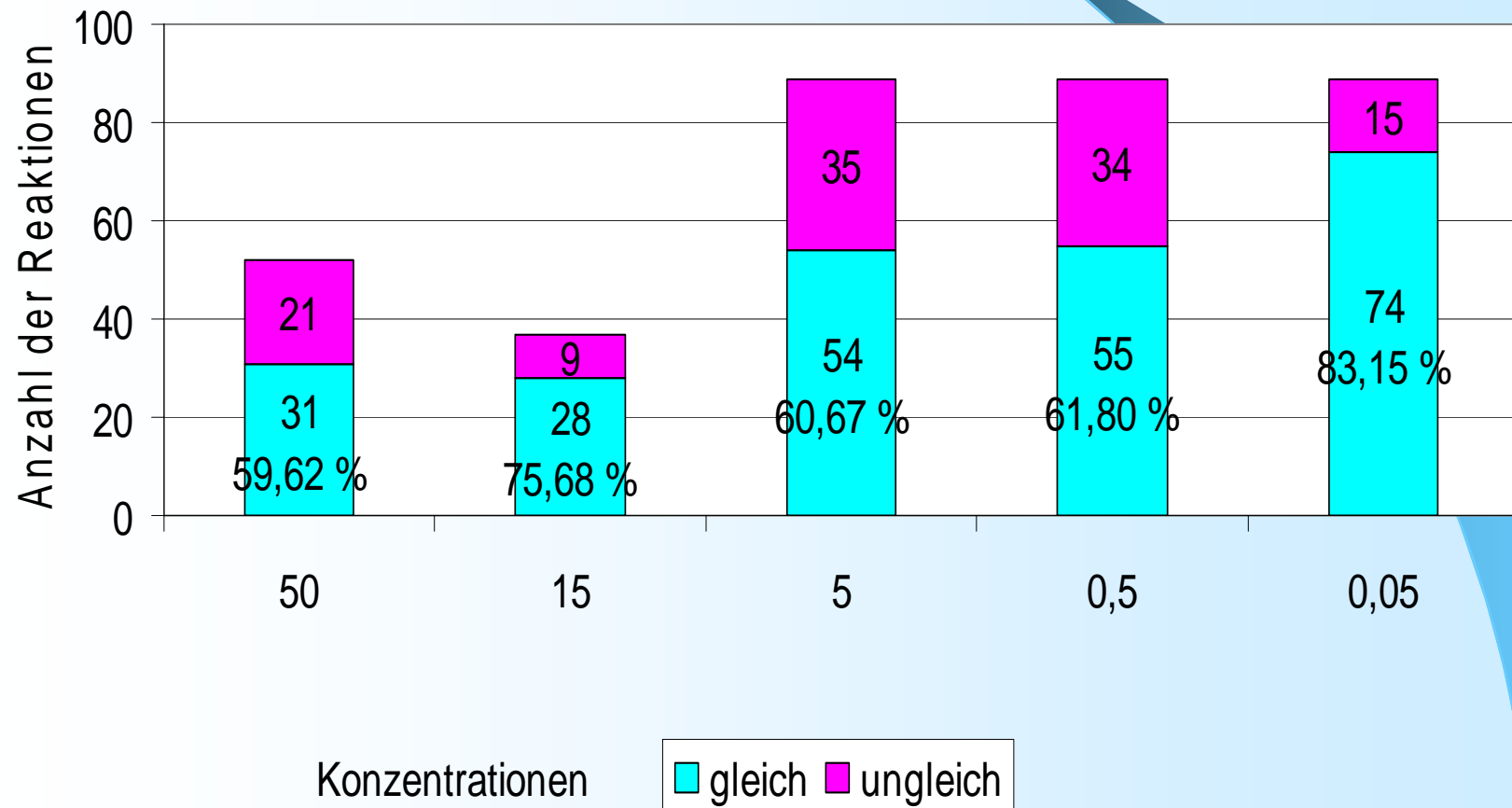




# Übereinstimmung FIT- intradermaler Hauttest Winter nach Konzentrationen



# Übereinstimmung FIT- intradermaler Hauttest Sommer und Winter





# Schlussfolgerungen

- Werden identische histaminfreie komplexe Allergenpräparationen von Insekten (*Culicoides nubeculosus* & *Tabanus* spp.) oder Futtermilben (*Dermatophagoides farinae* & *pteronyssinus*) in Konzentrationen von 0,05 bis 50 µg/ml intradermal an Mastzellen oder in-vitro an zeitgleich gewonnene autologe basophile Granulozyten verabreicht, so können in beiden Verfahren selektiv positive Reaktionen (Hautschwellung bzw. Histaminfreisetzung) innerhalb von 15 – 60 Minuten induziert werden.

# Schlussfolgerungen

- Die hier eingesetzten Allergenpräparationen zeigten in allen Konzentrationen eindeutig differenzierte Reaktionen (zwischen 0 = keine Reaktion bis 4 = höchstgradig starke Reaktionen – abhängig vom zu prüfenden Pferd) , so dass unspezifische Reaktionen auszuschließen sind.

# Schlussfolgerungen

- Im intradermalen Hauttest fielen die Reaktionen auf beide Insektenallergenpräparationen schwächer und auf beide Milbenallergenpräparationen tendenziell ähnlich aus wie im FIT. Dies deutet auf mögliche unterschiedliche Sensibilisierungsmuster bei Blutbasophilen und Hautmastzellen hin. Zudem sind unterschiedliche Regulationsmechanismen im Blut und in der Haut zu bedenken



# Schlussfolgerungen

- Während die Reproduzierbarkeit des FIT an der selben Blutprobe sehr hoch ist, zeigt sich die Reproduzierbarkeit im intradermalen Hauttest geringer für Culicoides bei 84,38 % für Tabanus bei 75 %, insgesamt bei 82,14 %. Demnach sind bei dem intradermalen Hauttestung nicht nur ein enger Spielraum zwischen positiven und negativen Reaktionen, sondern möglicherweise auch erhebliche lokale Reaktionsunterschiede zu beobachten.

# Schlussfolgerungen

- Die Übereinstimmung der Reaktionen zwischen Sommer und Winter liegen für den intradermalen Hauttest bei 73,75 %, für den FIT bei 70 %.

# Schlussfolgerungen

- Die Übereinstimmung zwischen dem FIT und dem intradermalen Hauttest liegt im Sommer bei 68,75 % im Sommer und 66 % im Winter. Diese Vergleichsuntersuchungen empfehlen den Intrakutantest und den FIT eher als sich ergänzende denn als alternative Verfahren zur Typ I-Allergiediagnostik beim Pferd. Dabei zeigt sich der FIT als technisch einfachere und in der Reproduzierbarkeit zuverlässigere zukünftige Methode.

