

Untersuchung der Testreaktionen in Allergen-Microarray und
Intradermaltest von Hunden mit atopischer Dermatitis unter
Berücksichtigung der allergisch bedingten Juckreizsymptomatik

von Stefanie Mallmann

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Untersuchung der Testreaktionen in Allergen-Microarray und
Intradermaltest von Hunden mit atopischer Dermatitis unter
Berücksichtigung der allergisch bedingten Juckreizsymptomatik

von Stefanie Mallmann

aus Hutthurm

München 2017

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Innere Medizin, Dermatologie und Neurologie der kleinen
Haustiere sowie klinische Labordiagnostik

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Univ.-Prof. Dr. Ralf Müller

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, PhD

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Ralf Müller

Korreferent/en: Priv.-Doz. Dr. Sabine André

Tag der Promotion: 29.07.2017

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Atopische Dermatitis.....	3
1.1.	Definition	3
1.2.	Epidemiologie	4
1.2.1.	Epidemiologie der humanen atopischen Dermatitis.....	4
1.2.2.	Epidemiologie der caninen atopischen Dermatitis.....	5
1.3.	Pathogenese	7
1.3.1.	Pathogenese der humanen atopischen Dermatitis	7
1.3.2.	Pathogenese der caninen atopischen Dermatitis	14
1.4.	Klinik der caninen atopischen Dermatitis	17
1.5.	Diagnose der caninen atopischen Dermatitis	18
1.6.	Therapie der caninen atopischen Dermatitis	20
1.6.1.	Allergenvermeidung/-reduktion	21
1.6.2.	Antibakterielle/Antimykotische Therapie	22
1.6.3.	Shampoos	23
1.6.4.	Essentielle Fettsäuren	23
1.6.5.	Antihistaminika	24
1.6.6.	Glukokortikoide	25
1.6.7.	Calcineurininhibitoren.....	26
1.6.8.	Oclacitinib	26
1.6.9.	Allergen-Immunotherapie	27
2.	Allergietest beim Hund	29
2.1.	Serumallergietest.....	30
2.2.	Intradermaltest.....	32
2.3.	Sensitivität und Spezifität von Intradermal- und Serumallergietest.....	35
2.4.	Erfolg der Allergen-Immunotherapie in Abhängigkeit von Intradermaltest und Serumallergietest	36
2.5.	Beeinflussung durch Medikamente	37
3.	Proteinmicroarrays in der humanen Allergiediagnostik.....	39
3.1.	Prinzip des Allergen-Microarrays	40
3.2.	Anwendung in der Allergiediagnostik	41

3.3.	Schwierigkeiten des Allergen-Microarrays.....	44
3.4.	Sensitivität und Spezifität.....	45
3.5.	Allergen-Microarray in der Tiermedizin.....	46
III.	MATERIAL UND METHODEN	47
1.	Studiendesign.....	47
2.	Patienten.....	47
2.1.	Einschlusskriterien	47
2.2.	Ausschlusskriterien	47
3.	Studiendurchführung	48
3.1.	Sedation.....	48
3.2.	Blutprobenentnahme	48
3.3.	Intradermaltest.....	49
3.4.	Microarray	52
4.	Statistik.....	55
IV.	ERGEBNISSE	57
1.	Patienten.....	57
1.1.	Geschlechtsverteilung	57
1.2.	Alter.....	57
1.3.	Rasseverteilung	57
1.4.	Gesundheitsstatus	57
1.5.	Futtermittelallergie	57
2.	Allergen-Microarray	59
2.1.	Allergenabhängige Reaktionen	59
2.2.	Beziehung von Microarray- und Intradermaltest-Reaktionen.....	60
2.3.	Beziehung von Microarray und Klinik.....	63
3.	Intradermaltest.....	64
3.1.	Allergenabhängige Intradermaltest-Rektionen	64
3.2.	Lebensraum	66
3.3.	Beziehung von Intradermaltest und Klinik	67
3.3.1.	Reaktion auf ganzjährige Allergene	68
3.3.2.	Reaktion auf saisonale Allergene	68

V.	DISKUSSION	71
1.	Ziel der Studie.....	71
2.	Geschlechts- und Rasseverteilung.....	71
3.	Testreaktionen der Studienpatienten im Allergen-Microarray	72
4.	Testreaktionen der Studienpatienten im Intradermaltest.....	76
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	85
VII.	SUMMARY.....	87
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	89
IX.	ANHANG	110
1.	Tabellenverzeichnis.....	110
2.	Abbildungsverzeichnis	110
3.	Besitzerfragebogen	112
4.	Juckreizskala	116
5.	Allergentabelle Microarray	117
6.	Verwendete Materialien und Geräte	122
6.1.	Zentrifugation des Serums	122
6.2.	Intradermaltest.....	122
6.3.	Microarray	122
6.4.	Statistische Auswertung	123
X.	DANKSAGUNG	125

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
°C	Grad Celsius
®	Registrierte Marke
ACVD	American College of Veterinary Dermatology
AD	atopische Dermatitis
AIT	allergen immunotherapy
ALD	atopic-like dermatitis
APC	antigenpräsentierende Zelle
ASIT	allergen-specific immunotherapy
AVS	automatic vibration system
Bet v 1	Hauptallergen der Birke (<i>Betula verucosa</i>)
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAP/RAST	Carrier-Polymer-System/Radio-Allergo-Sorbent-Test
CD	Cluster of differentiation
Co. KG	Compagnie Kommanditgesellschaft
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin
CRD	component resolved diagnosis
<i>D.</i>	<i>Dermatophagoides</i>
DC	dendritische Zellen
Der f	Allergengruppe der Hausstaubmilbe <i>Dermatophagoides farinae</i>
DHGLA	Dihomogammalinolensäure
EFA	essential fatty acids
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay

EPA	Eicosapentaensäure
FAD	flea allergy dermatitis
FAU	fluorescence arbitrary units
Fc	fragment crystallizable
FcεRI	Hochaffiner Immunglobulin E-Rezeptor
FFA	free fatty acid
FIAD	food-induced atopic dermatitis
FLG	Filaggrin-Gen
FLG-Gen	Filaggrin-Gen
Foxp3	Forkhead box 3
FSH	Frühjahr, Sommer und/oder Herbst
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
H ₁ -Rezeptor	Histamin H ₁ -Rezeptor
i. d. R.	in der Regel
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
IBD	inflammatory bowel disease
IBH	insect bite hypersensitivity
IDEC	Inflammatory dendritic epidermal cell
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IDT	Intradermaltest
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Inc.	Incorporation
JR	Juckreiz
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität

min	Minute
ml	Milliliter
NFIAD	non-food-induced atopic dermatitis
NJ	New Jersey
nm	Nanometer
NMF	natural moisturizing factors
nTreg	Natürliche regulatorische T-Zellen
NU	Noon Units
PBS	Phosphate buffered saline = Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PBST	Phosphate buffered saline + Tween [®] 20
PMT	photomultiplier tube
PNU	Protein Nitrogen Units
RAST	Radio-Allergo-Sorbent-Test
RESPIT	regionally-specific immunotherapy
<i>S.</i>	<i>Staphylococcus</i>
SA	Staphylococcus aureus
spp.	species pluralis
TGF	Transforming growth factor
Th	T-Helfer
Th-1	T-Helfer-1
Th-2	T-Helfer-2
Th-3	T-Helfer-3
TNF	tumor necrosis factor
Tr1-Zellen	Typ1 regulatorische Zellen
Treg	regulatory T-cell
TSLP	thymic stromal lymphopoietin
UK	Vereinigtes Königreich = United Kingdom
USA	Vereinigte Staaten von Amerika = United States of America

USA	United States of Amerika
V.	Vena
v.a.	vor allem
w/v	weight per volume
WAO	World Allergy Organisation
z. B.	zum Beispiel

I. EINLEITUNG

Bei der caninen atopischen Dermatitis (AD) handelt es sich um eine „genetisch prädisponierte, entzündliche und juckende allergische Erkrankung der Haut mit charakteristischen klinischen Merkmalen, die IgE-Antikörper assoziiert und meistens gegen Umweltallergene gerichtet ist“ (Definition der American College of Veterinary Dermatology (ACVD) Taskforce for canine atopic dermatitis) (HALLIWELL, 2006). Lange Zeit wurde die canine AD als eine rein IgE-medierte Erkrankung gesehen. Heute weiß man jedoch, dass die Pathogenese dieser multifaktoriell bedingten Erkrankung ein komplexes Zusammenspiel von verschiedenen genetischen und umweltabhängigen Faktoren ist, welche die Immunantwort und Hautbarriere der betroffenen Tiere beeinflussen (MARSELLA et al., 2012).

Aus diesem Grund ist die Diagnose der Erkrankung häufig schwierig und kann bis zum heutigen Zeitpunkt lediglich durch Ausschluss der Differentialdiagnosen gestellt werden (DEBOER & HILLIER, 2001a). Die in der Tiermedizin kommerziell verfügbare IgE-Bestimmung mittels ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) und der Intradermaltest eignen sich nicht zur Diagnose der caninen AD, sondern werden lediglich zur Identifikation der allergieauslösenden Allergene eingesetzt (DEBOER & HILLIER, 2001b; HILLIER & DEBOER, 2001). Als „Goldstandard“ gilt derzeit der Intradermaltest, welcher die IgE-medierte Degranulation kutaner Mastzellen bei Allergenkontakt widerspiegelt (HILLIER & DEBOER, 2001; HENSEL et al., 2015; POPIEL & CEKIERA, 2015). Die Sensitivität und Spezifität der derzeitigen Testmethoden sind begrenzt und variieren stark (HÄMMERLING & DE WECK, 1998; WASSOM et al., 1998; FOSTER et al., 2003). Aus diesem Grund wäre die Entwicklung alternativer Testmethoden wünschenswert.

Mit dem Allergen-Microarray steht in der Humanmedizin eine vielversprechende Methode der molekularen Allergiediagnostik zur Verfügung. Dabei werden auf ein Trägermaterial hunderte verschiedene, gereinigte oder rekombinant hergestellte Proteine auf kleinstem Raum aufgebracht und mit einem sehr geringen Volumen an Patientenserum inkubiert. Die gebundenen Antikörper aus dem Serum werden mittels Fluoreszenz und Laserscanner detektiert (HARWANEGG et al., 2003;

HARWANEGG & HILLER, 2005). Durch die Miniaturisierung des Verfahrens und die große Anzahl getesteter Allergene in einem Testschritt ermöglicht der Allergen-Microarray die Erstellung genauer Sensibilisierungsprofile der Patienten und dadurch die optimierte Zusammenstellung einer Immunotherapie (OTT et al., 2006).

Bisher ist der Microarray für die Tiermedizin nicht kommerziell verfügbar und wurde lediglich beim Pferd getestet, lieferte dort jedoch vielversprechende Ergebnisse (MARTI et al., 2015). In dieser Studie wurde bei atopischen Hunden ein Proteinmicroarray und ein Intradermaltest durchgeführt. Ziel war es, die Ergebnisse beider Testmethoden untereinander und mit der Klinik der Hunde zu vergleichen, um so einen Eindruck über deren Aussagekraft zu erlangen.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Atopische Dermatitis

1.1. Definition

Die Definition der atopischen Dermatitis hat sich im Laufe der Jahre häufig geändert und unterliegt einer ständigen Anpassung an neue Erkenntnisse der immunologischen Forschung. Die World Allergy Organisation (WAO) hat versucht eine weltweit anerkannte Nomenklatur festzulegen. Sie definiert die Atopie als eine persönliche oder vererbte Tendenz zur Sensibilisierung und Ausbildung von IgE-Antikörpern bereits bei einer Exposition mit einer normalen Menge an Allergenen. Führt die Atopie durch eine IgE-medierte Reaktion zum Auftreten von allergischen Symptomen, kann das Adjektiv atopisch verwendet werden (JOHANSSON et al., 2004).

Treten nach einer Allergen-Exposition, die von gesunden Individuen toleriert wird, reproduzierbare Symptome auf, spricht man von Hypersensitivität. Die Allergie gilt als eine, durch spezifische immunologische Mechanismen initiierte, Hypersensitivitätsreaktion (HALLIWELL, 2006). Die Allergie muss nicht zwangsläufig Antikörper-mediert sein, es kann auch eine Zell-medierte Form vorliegen. Deshalb kann die Allergie nicht nur durch eine gesteigerte Anzahl an IgE-Antikörpern definiert werden (JOHANSSON et al., 2004).

Dermatitis wird als Überbegriff für eine lokale Entzündung der Haut verwendet. In manchen Ländern wird der Begriff Ekzem gleichgesetzt mit Dermatitis. Dies ist aber nach den aktuellen Nomenklaturempfehlungen nicht ganz korrekt, da die Dermatitis auch Unterbegriffe, wie Kontaktdermatitis und andere Dermatitisformen, umfasst. Wird das Ekzem durch eine IgE-medierte Entzündung hervorgerufen, kann es als atopisches Ekzem bezeichnet werden (JOHANSSON et al., 2004).

Diese Nomenklatur wird größtenteils auch in der Veterinärmedizin verwendet. Die canine atopische Dermatitis wird definiert als „genetisch prädisponierte, entzündliche und juckende allergische Erkrankung der Haut mit charakteristischen klinischen Merkmalen, die IgE-Antikörper assoziiert ist und meistens gegen Umweltallergene gerichtet ist“ (Definition der ACVD Taskforce for canine atopic

dermatitis) (HALLIWELL, 2006). Wird davon ausgegangen, dass die Sensibilisierung ausschließlich gegen Umweltallergene erfolgt ist, spricht man von caniner AD *sensu stricto* oder „non-food-induced atopic dermatitis“ (NFIAD). Spielen neben den Umweltallergenen auch Futtermittelallergene eine Rolle bei der Entstehung der Symptome, wird die Erkrankung als canine AD *sensu lato* bezeichnet, bei ausschließlicher Verursachung durch Futterantigene als „food-induced atopic dermatitis“ (FIAD) (PICCO et al., 2008; FAVROT et al., 2010). Um die Beteiligung von Futtermittelallergenen zu evaluieren, muss eine Eliminationsdiät bei dem Patienten durchgeführt werden.

Zeigen Hunde klinische Symptome einer AD ohne dass eine Beteiligung von IgE-Antikörpern am Geschehen festgestellt werden kann, spricht man von caniner, atopie-ähnlicher Dermatitis (HALLIWELL, 2006).

1.2. Epidemiologie

1.2.1. Epidemiologie der humanen atopischen Dermatitis

Die Prävalenz der atopischen Dermatitis steigt stetig an, derzeit sind weltweit etwa 20 % der Kinder und bis zu 3 % der Erwachsenen betroffen. Typischerweise tritt die atopische Dermatitis in der frühen Kindheit das erste Mal auf und geht bei einem Großteil der Betroffenen in andere allergische Erkrankungen, wie z.B. Heuschnupfen oder Asthma, über. So entwickeln etwa 50 % der Kinder mit AD innerhalb ihres ersten Lebensjahres und 85 % innerhalb der ersten fünf Lebensjahre andere allergische Erkrankungen. Bei den meisten Patienten (~ 70 %) tritt vor der Pubertät eine spontane Remission auf (NUTTEN, 2015). Die Prävalenz weist je nach geographischer Region starke Schwankungen auf. In Indien sind etwa 0,9 % der Kinder im Alter von sechs bis sieben Jahren von AD betroffen, wohingegen in Ecuador die Prävalenz bei 22,5 % liegt. In China sind lediglich 0,2 % der 13 bis 14-Jährigen an AD erkrankt, in Kolumbien 24,6 %. Generell leiden mehr Mädchen als Jungen an der Erkrankung (WILLIAMS, 2013).

Schon lange wird eine familiäre Komponente bei der Entwicklung der AD vermutet, was durch Studien bei Zwillingkindern bestätigt wurde (WILLIAMS, 2013). Mutationen am FLG-Gen (Filaggrin-Gen), welches das epidermale Protein Filaggrin kodiert, sind mit die wichtigsten genetischen Veränderungen. In manchen Populationen wurde bei bis zu 50 % der an atopischer Dermatitis erkrankten Patienten eine solche Mutation festgestellt. Filaggrin spielt eine wesentliche Rolle

bei der Anordnung der Kerneozyten im Zellverband und der Aufrechterhaltung des pH-Wertes der Haut. Kann das Protein auf Grund der Genmutation nicht korrekt gebildet werden, können Umweltallergene einfacher und vermehrt durch die defekte Hautbarriere eindringen und mit den lokalen Immunzellen interagieren (NUTTEN, 2015).

Starke Schwankungen der Prävalenz zwischen unterschiedlichen Ländern und innerhalb eines Landes lassen jedoch vermuten, dass die genetische Komponente im Vergleich zu den Umweltfaktoren eine eher kleinere Rolle bei der Entwicklung der atopischen Dermatitis spielt. Übergewicht, ein urbanes Umfeld, der Einsatz von Antibiotika oder Luftverschmutzung stellen beispielsweise Risikofaktoren für die Entwicklung einer atopischen Dermatitis dar (NUTTEN, 2015). Verschiedene Feststellungen, wie beispielsweise die höhere Prävalenz von AD in Familien mit einer geringen Anzahl an Kindern, führte zur Aufstellung der sogenannten „Hygiene-Hypothese“. Diese besagt, dass die atopische Dermatitis dann auftreten kann, wenn das Immunsystem in der frühen Phase seiner Entwicklung nicht der obligatorischen Stimulation durch verschiedene mikrobielle Antigene ausgesetzt ist. So kann z. B. die regelmäßige Aufnahme von unpasteurisierter Milch in den ersten zwei Lebensjahren oder das Zusammenleben mit einem Hund während der frühen Kindheit einen protektiven Effekt gegenüber der AD haben (WILLIAMS, 2013).

1.2.2. Epidemiologie der caninen atopischen Dermatitis

In der Tiermedizin sind die genaue Inzidenz und Prävalenz der caninen atopischen Dermatitis nicht bekannt (HILLIER & GRIFFIN, 2001b; NØDTVEDT et al., 2006). Die Prävalenz wird in verschiedenen Studien mit 3-15 % angegeben. Hierzu liegen aber leider keine zuverlässigen epidemiologischen Daten vor. Die genaue Anzahl betroffener Hunde festzustellen ist sehr schwierig, da bei einer milden Erkrankung häufig die symptomatische Therapie einer spezifischen Diagnose vorgezogen wird oder die Symptome nicht als Anzeichen einer AD erkannt werden (HILLIER & GRIFFIN, 2001b). In einer Studie von Lund et al. aus dem Jahre 1999 wurden 31.484 Hunde in 52 privaten Tierarztpraxen in den USA untersucht. Bei 8,7 % der Hunde wurde eine atopische Dermatitis, eine Allergie oder Atopie diagnostiziert. Eine schwedische Studie beziffert die Inzidenz der AD in der Population schwedischer Hunde auf 1,7 von 1000 Hunden. In dieser Studie wurden jedoch nur Hunde mit der eindeutigen Diagnose „atopische Dermatitis“ in die

Statistik aufgenommen, Hunde mit unspezifischer Diagnose, wie z.B. „Allergische Dermatitis“, wurden ausgeschlossen. Die tatsächliche Inzidenz dürfte aus diesem Grund höher liegen (NØDTVEDT et al., 2006).

Viele Experten halten die canine AD, nach der Flohspeichelallergie, für die zweithäufigste Ursache von Juckreiz beim Hund. In Kanada, Frankreich und Griechenland wurden jedoch Studien publiziert, die das Gegenteil behaupten und laut denen die canine AD deutlich häufiger auftritt als die Flohspeicheldermatitis (HILLIER & GRIFFIN, 2001b).

Auch beim Hund wird vermutet, dass Umweltfaktoren eine deutlich größere Rolle bei der Entstehung der AD spielen als die genetische Komponente. Für den zu beobachtenden Anstieg der Inzidenz werden deshalb auch hier die Veränderungen der Lebensumstände verantwortlich gemacht. Hunde verbringen heutzutage deutlich mehr Zeit im Haus als früher die reinen Hofhunde. Sie sind somit einer viel höheren Konzentration der üblicherweise im Haushalt vorkommenden Allergene, wie z. B. Hausstaubmilben, ausgesetzt (HILLIER & GRIFFIN, 2001b).

Die regelmäßige Bekämpfung von Endo- und Ektoparasiten könnte im Rahmen der Hygiene-Hypothese auch zu einem Anstieg der Inzidenz beitragen (HILLIER & GRIFFIN, 2001b).

Genau wie beim Menschen erkranken in einem urbanen Umfeld deutlich mehr Tiere an AD (57 % mehr Fälle in urbanen Gegenden im Vergleich zur Restpopulation). Dies kann einmal mit der Hygiene-Hypothese begründet werden, aber auch damit, dass in einer urbanen Umgebung eine höhere Dichte an Tierarztpraxen herrscht, in welchen Tiere mit AD vorgestellt werden (NØDTVEDT et al., 2006).

In Schweden haben Welpen die im Herbst geboren werden, ein höheres Risiko an atopischer Dermatitis zu erkranken. Die meisten Hunde in Schweden reagieren allergisch auf Hausstaubmilben. Dadurch, dass die im Herbst zur Welt gekommenen Welpen in den ersten sechs Lebensmonaten die meiste Zeit des Tages im Haus verbringen, sind sie mehr Hausstaub und damit potentiell Allergen ausgesetzt (NØDTVEDT et al., 2006). In einer Studie wurde gezeigt, dass eine frühzeitige Allergenexposition zu einer erhöhten IgE-Produktion bei genetisch prädisponierten Hunden führt. Man vermutet, dass eine Allergenvermeidung im frühen Leben einen protektiven Effekt hat (SCHISSL et al., 2003).

In Studien konnten verschiedene Rasseprädispositionen für die canine atopische Dermatitis festgestellt werden, welche jedoch auf Grund der unterschiedlichen genetischen Populationen und Inzidenz der Rassen in der jeweiligen Region starken geographischen Schwankungen unterliegen (JAEGER et al., 2010). In der Schweiz sind vor allem West Highland White Terrier, Boxer, Französische Bulldogge, Magyar Vizsla, Bullterrier und Rhodesian Ridgeback betroffen (PICCO et al., 2008). In einer schwedischen Studie konnten als prädisponierte Rassen Bullterrier, Welsh Terrier, Boxer, West Highland White Terrier und Deutscher Schäferhund ermittelt werden (NØDTVEDT et al., 2006). Laut der Studie von Jaeger et al. (2010), welche die Rasseprädisposition in fünf unterschiedlichen Regionen untersucht haben, scheinen Golden Retriever und Deutscher Schäferhund in den meisten geographischen Gebieten für die Entwicklung einer caninen AD prädisponiert zu sein .

Bezüglich einer Geschlechtsprädisposition liefern Studien unterschiedliche Ergebnisse (GRIFFIN & DEBOER, 2001). Neuere Studien konnten jedoch keine Prädisposition eines Geschlechts feststellen (NØDTVEDT et al., 2006; NØDTVEDT et al., 2007; PICCO et al., 2008).

1.3. Pathogenese

1.3.1. Pathogenese der humanen atopischen Dermatitis

Lange Zeit wurde die AD hauptsächlich als eine T-Helfer-2 (TH2)-dominierte Entzündungsreaktion und einer daraus resultierenden überschießenden Produktion von IgE-Antikörpern angesehen (BIEBER, 2013; EYERICH & NOVAK, 2013). Heute weiß man jedoch, dass dies eine zu vereinfachte Sicht der Krankheit darstellt. Vielmehr ist die Pathogenese der AD ein multifaktorielles komplexes Zusammenspiel immunologischer, genetischer und umweltbedingter Faktoren (NOVAK et al., 2003; BIEBER, 2013). Hauptverantwortlich für die Entstehung einer AD sind Störungen des angeborenen und erworbenen Immunsystems, sowie eine verminderte Barrierefunktion der Haut. Welche der Fehlfunktionen jedoch am Beginn der Erkrankung steht, wird weiterhin diskutiert (BOGUNIEWICZ & LEUNG, 2011; EYERICH & NOVAK, 2013). Verfechter der „Inside-Out-Hypothese“ sehen in der AD primär eine immunologische Störung. Sie machen die Th2-dominierte Entzündung für die sekundär entstehende Beeinträchtigung der Hautbarriere verantwortlich. Es lassen sich jedoch auch zahlreiche Argumente für

die „Outside-In-Hypothese“ finden. Hier wird davon ausgegangen, dass im Vordergrund der Krankheit die Störung der Hautbarriere steht. Diese sorgt dafür, dass Allergene leichter über die Haut in den Organismus eindringen können und es dort zu einer Sensibilisierung gegenüber verschiedensten Antigenen kommt (BRANDT & SIVAPRASAD, 2011; EYERICH & NOVAK, 2013; KUO et al., 2013). Immer mehr Anhänger findet die „Outside-Inside-Outside-Hypothese“. Man nimmt an, dass am Beginn der Erkrankung eine Fehlfunktion der epidermalen Barriere vorliegt, welche zu Entzündung und Immunmodulationen führt, wodurch wiederum sekundär die Hautbarriere geschädigt wird (ELIAS et al., 2008; JURAKIĆ TONČIĆ & MARINOVIĆ, 2016). Im Folgenden sollen einige der wichtigsten Mechanismen in der Entstehung der atopischen Dermatitis näher beleuchtet werden.

Nach dem Eindringen der Allergene durch die gestörte Hautbarriere werden diese von antigenpräsentierenden Zellen (APCs) abgefangen und aufgenommen. Eine Gruppe der APCs, die sogenannten Langerhans Zellen (dendritische Zellen der Haut) wandern danach in die regionalen Lymphknoten und präsentieren dort die aufgenommenen Antigene den naiven T-Zellen. Angeregt durch die Präsentation der Antigene kommt es zur Differenzierung der T-Zellen in allergen-spezifische CD4⁺ (cluster of differentiation 4) Th2 Zellen und Sekretion von Th2 Zytokinen wie IL (Interleukin)-4, IL-5 und IL-13. Die Zytokinausschüttung führt ihrerseits zu einem Immunglobulin-Klassenwechsel zu IgE und zur Bildung und klonalen Expansion von IgE-produzierenden B-Gedächtniszellen. Die allergen-spezifischen IgEs binden an den hochaffinen IgE-Rezeptor FcεRI auf der basophilen Granulozyten- und Mastzelloberfläche und führen dadurch zu einer Sensibilisierung dieser Zellen (LOEWENSTEIN & MUELLER, 2009). Bei erneuter Exposition führt das Allergen zu einer Quervernetzung der IgE-FcεRI-Komplexe und damit zur Degranulation der Mastzellen und basophilen Granulozyten. Die daraus freigesetzten vasoaktiven Amine (hauptsächlich Histamin), Leukotriene, Prostaglandine, Chemokine und Zytokine rufen eine unmittelbare allergische Reaktion, mit Symptomen wie Juckreiz, Ödem, Nesselsucht und schlimmstenfalls Anaphylaxie, hervor. Diese sehr schnell in Gang kommende Kaskade wird als Typ-I-Hypersensitivitätsreaktion oder Reaktion vom Soforttyp bezeichnet (LARCHE et al., 2006).

Angelockt durch die ausgeschütteten Chemokine und Zytokine wandern weitere

Entzündungszellen und allergen-spezifische T-Lymphozyten ins Entzündungsgebiet ein. Dort kommt es zu einer Reaktivierung und klonalen Expansion dieser T-Lymphozyten, welche durch die ebenfalls mittels IgE-sensibilisierten, allergenpräsentierenden dendritischen Zellen (DC) noch verstärkt wird (LARCHE et al., 2006). Durch die Bindung der Allergene degranulieren die angelockten Mastzellen, eosinophilen und basophilen Granulozyten. Dies führt zu einer lokalen Entzündungsreaktion mit Rötung, Schmerz, Ödem und Wärme und wird als „late-phase-reaction“ (Spätphasenreaktion) bezeichnet, da sie erst nach ca. sechs bis neun Stunden auftritt. Nach 24 bis 48 Stunden klingen die Symptome in der Regel wieder ab (LARCHE et al., 2006; LOEWENSTEIN & MUELLER, 2009).

Wie bereits erwähnt, kommt es in der initialen Phase der atopischen Dermatitis zu einer Th2-dominierten Immunantwort. Über die Differenzierung der naiven T-Zellen entscheidet maßgeblich das Zytokinmilieu (HARSKAMP & ARMSTRONG, 2013). So differenzieren sich diese bei Erkennung ihres spezifischen Allergens unter Einfluss von Th2-Zytokinen, wie beispielsweise IL-4 und IL-13, in Th2-Lymphozyten (YAMANAKA & MIZUTANI, 2011). Bei Patienten mit AD scheint eine genetisch bedingte Dominanz dieser Zytokine vorzuliegen (BIEBER, 2008). Zusätzlich kommt es im peripheren Blut zu einer vermehrten Apoptose der zirkulierenden Th1-Lymphozyten bei gleichzeitiger Erhaltung der Th2-Zellen (HARSKAMP & ARMSTRONG, 2013). Eine wichtige Rolle scheint außerdem das Zytokin thymic stromal lymphopoietin (TSLP) zu spielen. Die Keratinozyten von an AD erkrankten Personen sezernieren dieses in erhöhtem Maße (SOUMELIS et al., 2002). TSLP führt zu einer verstärkten Th2 Differenzierung durch DCs (BIEBER, 2008; EYERICH & NOVAK, 2013). Auch Umweltreize, wie Hautverletzungen oder Staphylokokkenprodukte, führen zu einem Anstieg der TSLP Produktion durch die Keratinozyten (EYERICH & NOVAK, 2013). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass am Beginn der AD ein Zytokinmilieu herrscht, welches eine Th2 dominierte Immunantwort auslöst.

Die Entzündungsreaktion der atopischen Dermatitis verläuft in zwei Phasen. In der akuten Phase überwiegt, wie zuvor beschrieben, die Th2 Antwort. In der chronischen Phase dominieren jedoch Th1-Lymphozyten und deren spezifische Zytokine (BIEBER, 2008; HARSKAMP & ARMSTRONG, 2013). Während Th 2-Zellen in den akuten Läsionen vermehrt IL-4, IL-5 und IL-13 freisetzen, kommt es

in den chronischen Läsionen hauptsächlich zur Sekretion von Interferon-Gamma (IFN- γ), IL-12 und des granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) (BIEBER, 2008; YAMANAKA & MIZUTANI, 2011). Das von den Th2-Zellen ausgeschüttete IL-4 induziert die B-Zell Aktivierung und Proliferation und somit die Produktion von IgE-Antikörpern. Zudem hemmt IL-4 die Differenzierung von naiven T-Zellen in Th1-Lymphozyten (PALUDAN, 1998). Der Gegenspieler ist das von den Th1-Zellen sezernierte IFN- γ . Es inhibiert die Th2-Differenzierung und stabilisiert die Th1-Zellen. Außerdem führt es zu einer vermehrten Expression von IL-12, was zu einer zusätzlichen Stabilisierung der Th1-Zellen beiträgt (PALUDAN, 1998; YAMANAKA & MIZUTANI, 2011). Neben der Aufrechterhaltung eines proinflammatorischen Milieus induziert IFN- γ auch eine Fibrose der Haut. Dies erklärt die charakteristische Lichenifikation der Haut im chronischen Stadium der AD (YAMANAKA & MIZUTANI, 2011). Wie genau es zu einem Wechsel von Th2 in eine Th1 polarisierte Immunantwort kommt, ist noch nicht geklärt (EYERICH & NOVAK, 2013). Eine Rolle scheinen jedoch die sogenannten „inflammatory dendritic epidermal cells“ (IDECs) zu spielen. Sie entwickeln sich aus Monozyten, die durch IgE-sensibilisierte Langerhanszellen und deren Zytokine ins Gewebe gelockt wurden. Diese produzieren neben den proinflammatorischen Zytokinen IL-1, IL-6 und tumor necrosis factor α (TNF- α) auch IL-12 sowie IL-18 und tragen somit zur Umstellung von Th2 zu Th1 bei (BIEBER, 2008). Die atopische Dermatitis ist also, wie bereits zu Beginn erwähnt, nicht ausschließlich eine Th2-dominierte Entzündungsreaktion.

Klassischerweise liegt auf Grund der beschriebenen Vorgänge bei Patienten mit atopischer Dermatitis eine Erhöhung des IgE-Blutspiegels vor (YAMANAKA & MIZUTANI, 2011). Bei ca. 15 % der Erkrankten fehlen jedoch spezifische IgE-Antikörper und es können keine erhöhten IgE-Serumspiegel gemessen werden. Diese Form wird als intrinsische atopische Dermatitis bezeichnet (ROGUEDAS-CONTIOS & MISERY, 2011). Die Pathophysiologie der intrinsischen AD liegt noch weitestgehend im Dunkeln.

In den letzten Jahren wird das Augenmerk der Forschung vermehrt auf eine weitere Gruppe der T-Zellen, die sogenannten regulatorischen T-Zellen (Treg), gelegt. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der atopischen Dermatitis (AGRAWAL et al., 2011; HONDA et al., 2011). Man kann die regulatorischen T-Zellen grob in „natürliche“ und „induzierte“ Treg einteilen. Die „natürlichen“

regulatorischen T-Zellen (nTreg) stammen aus dem Thymus und exprimieren auf ihrer Oberfläche CD25 (Cluster of differentiation 25), sowie den Transkriptionsfaktor Foxp3 (forkhead box 3) (AGRAWAL et al., 2011). In gesunden Individuen machen diese CD25⁺Foxp3⁺ Treg etwa 5-10% der CD4⁺ T-Zellen aus (LOSER & BEISSERT, 2012). Die „induzierten“ oder „adaptiven“ regulatorischen T-Zellen entwickeln sich hingegen aus naiven T-Zellen in der Peripherie, induziert durch Antigene. Zu ihnen zählen beispielsweise die Tr1- (type 1-like regulatory T cells) und Th3-Zellen (HONDA et al., 2011). Durch verschiedene Mechanismen hemmen die Treg-Zellen die Differenzierung, Aktivierung, Proliferation, Migration oder Zytokin-Sekretion von herkömmlichen T-Zellen. Über die genauen Abläufe dieser Mechanismen ist jedoch bisher nur wenig bekannt. In vitro Versuche konnten zeigen, dass die Hemmung unter anderem durch einen Zellkontakt-abhängigen Mechanismus erfolgt (HONDA et al., 2011; LOSER & BEISSERT, 2012). Tregs induzieren beispielsweise die Expression von Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) in dendritischen Zellen. IDO katabolisiert die Umwandlung von Tryptophan in Kynurenin, eine v.a. für T-Zellen toxische Aminosäure (GROHMANN et al., 2002). Außerdem hemmen regulatorische T-Zellen indirekt die T-Zell-Proliferation, indem sie über verschiedene Mechanismen die Funktionen der APCs beeinflussen und einschränken (HONDA et al., 2011). Die immunsuppressiven Eigenschaften der Tregs werden aber auch durch verschiedene lösliche Faktoren vermittelt. So sezernieren Tregs unter anderem die Zytokine IL-10, TGF- β (transforming growth factor beta) und IL-35 (AGRAWAL et al., 2011; LOSER & BEISSERT, 2012).

Ob diese in vitro festgestellten Abläufe jedoch auch in vivo relevant sind und welchen Einfluss sie auf den Verlauf einer Erkrankung haben, muss erst noch geklärt werden (AGRAWAL et al., 2011). Durch die sehr heterogene Population der regulatorischen T-Zellen und die vielen Faktoren, welche die Funktion der Tregs beeinflussen, ist die Erforschung dieser speziellen T-Zell-Gruppe sehr schwierig. So liefern Studien beispielsweise sehr unterschiedliche Ergebnisse zum Auftreten der Tregs bei der atopischen Dermatitis. Mehrere Studien konnten nachweisen, dass die Anzahl der regulatorischen T-Zellen bei AD-Patienten im peripheren Blut erhöht ist und direkt mit der Schwere der Erkrankung korreliert (OU et al., 2004; ITO et al., 2009). Es gibt aber auch Studien bei denen die gemessenen Werte der Tregs bei erkrankten und gesunden Menschen ähnlich hoch

waren (VERHAGEN et al., 2006; SZEGEDI et al., 2009). Es wird davon ausgegangen, dass die regulatorischen T-Zellen bei AD-Patienten einen Funktionsverlust, ausgelöst durch verschiedene Faktoren, aufweisen und dadurch in ihren immunmodulatorischen Eigenschaften eingeschränkt sind (AGRAWAL et al., 2011). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass das Staphylokokkenenterotoxin B zu einem Verlust der immunsuppressiven Funktionen von regulatorischen T-Zellen führen kann (OU et al., 2004).

Trotz der noch nicht vollständig aufgeklärten in vivo Mechanismen der Tregs und den sehr unterschiedlichen Studienergebnissen scheinen die regulatorischen T-Zellen und ihre Zytokine eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der atopischen Dermatitis zu spielen (AGRAWAL et al., 2011).

Wie einleitend erwähnt, scheint auch eine geschädigte Hautbarriere großen Anteil an der Entstehung einer atopischen Dermatitis zu haben. Die epidermale Barriere stellt eine Grenzlinie zwischen der Umgebung und dem Körper dar und schützt so den Organismus gegen das Eindringen von Allergenen oder Mikroorganismen. Die Fehlfunktion der Hautbarriere bei Patienten mit atopischer Dermatitis ist durch das Zusammenspiel verschiedener Faktoren – wie genetischen Mutationen, Umwelteinflüssen oder Entzündungen – bedingt (JURAKIĆ TONČIĆ & MARINOVIĆ, 2016).

Obwohl bei der AD bis heute zahlreiche genetische Anomalien festgestellt werden konnten, scheint eine loss-of-function Mutation im Filaggrin-Gen (FLG) die wichtigste genetische Veränderung zu sein und den meisten Einfluss zu haben. Sie führt zu einem reduzierten bzw. fehlenden Gehalt an epidermalem Filaggrin (BOGUNIEWICZ & LEUNG, 2011; EYERICH & NOVAK, 2013; JURAKIĆ TONČIĆ & MARINOVIĆ, 2016). In der nordeuropäischen und asiatischen Population stellt eine solche Mutation den größten Risikofaktor für eine AD-Erkrankung dar und geht mit einem frühen Beginn und einem schwereren Verlauf der Erkrankung einher. In Nordeuropa kann bei etwa 25 – 50 % der AD-Erkrankten eine Mutation des Filaggrin-Gens nachgewiesen werden (THYSSEN & KEZIC, 2014). Filaggrin aggregiert Keratin-Filamente und trägt so zur Abflachung und Formation der Korneozyten bei (CABANILLAS & NOVAK, 2016). Die Abbauprodukte von Filaggrin fungieren außerdem in der Haut als natürliche feuchtigkeitsspendende Faktoren, sogenannte natural moisturizing factors (NMF). Diese NMFs regulieren nicht nur den Feuchtigkeitsgehalt des Stratum corneums,

sondern tragen außerdem zur Aufrechterhaltung des pH-Wertes bei. Ein verminderter Gehalt an NMFs führt zu einem transepidermalen Wasserverlust und einem Anstieg des pH-Wertes der Haut und setzt so z.B. die Abwehr gegenüber bakteriellen Mikroorganismen herab (THYSSEN & KEZIC, 2014; JURAKIĆ TONČIĆ & MARINOVIĆ, 2016). Ein Anstieg des pH-Wertes führt zudem zur Aktivierung von pH-sensitiven Serin-Proteasen. Diese Serin-Proteasen führen z.B. nicht nur zu geschwächten interzellulären Verbindungen, sondern auch zur Freisetzung von TSLP und einer damit verbundenen Th2-dominierten Entzündung (BRIOT et al., 2009; THYSSEN & KEZIC, 2014).

Neben einer FLG-Mutation können aber auch noch andere Faktoren, wie eine niedrige Luftfeuchtigkeit, hautreizende Stoffe oder Hautverletzungen durch Juckreiz, zu einem Absinken des Filaggrin-Gehalts führen (THYSSEN & KEZIC, 2014). Auch verschiedene Th2-Zytokine – wie IL-4, IL-13, IL-17, IL-22 oder IL-33 – vermindern die Filaggrin-Expression und führen zu einem Teufelskreis von geschädigter Hautbarriere und Th2-vermittelter Entzündung (THYSSEN & KEZIC, 2014; CABANILLAS & NOVAK, 2016).

Neben Filaggrin spielen verschiedene Lipide (Ceramide, Cholesterol, freie Fettsäuren) eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung der Hautbarriere, da sie einen Wasserverlust über die Haut verhindern (NOVAK et al., 2003; JURAKIĆ TONČIĆ & MARINOVIĆ, 2016). Bei Patienten mit atopischer Dermatitis ist der Gehalt dieser hydrophilen Lipide, v.a. einiger Ceramide, deutlich vermindert (IMOKAWA et al., 1991). Durch den Wasserverlust kommt es zu einer Destabilisierung der Hautbarriere und Allergene können vermehrt eindringen (NOVAK et al., 2003).

Die Haut von gesunden Individuen ist mit einer Vielzahl an unterschiedlichen Mikroorganismen besiedelt. Diese können in eine ständig anwesende und eine transiente Population unterteilt werden. Zur ersteren Gruppe zählen v.a. Koagulase-negative Staphylokokken wie z.B. *Staphylococcus (S.) epidermidis*, *S. haemolyticus* oder *S. hominis*. Die transiente Flora entsteht durch Kontakt mit der Umwelt und ändert sich ständig (LIN et al., 2007; JURAKIĆ TONČIĆ & MARINOVIĆ, 2016). Bei über 90 % der AD-Patienten konnte eine Kolonialisierung der Haut mit *Staphylococcus aureus* nachgewiesen werden (LEYDEN et al., 1974). *S. aureus* gehört jedoch bei der gesunden Hautflora nicht zur ständigen Population (LIN et al., 2007). Durch den verminderten pH-Wert der Haut und den reduzierten Gehalt an freien Fettsäuren (FFA) und Sphingosin (ein

antimikrobiell wirkender Ceramid-Metabolit) kommt es bei der atopischen Dermatitis zu dieser Überwucherung. *S. aureus* wiederum vermindert die epidermale Produktion von FFA und stimuliert die Hydrolyse von Ceramiden (KITA et al., 2002; CLARKE et al., 2007). Somit ist die Kolonisation mit *S. aureus* sowohl Auslöser als auch Konsequenz einer allergisch bedingten Entzündungen der Haut (JURAKIĆ TONČIĆ & MARINOVIĆ, 2016).

Ca. 70 % der bei AD vorkommenden *S. aureus* Stämme können Enterotoxine bilden. Diese Enterotoxine können als Superantigene fungieren und die klinische Ausprägung der atopischen Dermatitis über verschiedene Mechanismen verstärken (JURAKIĆ TONČIĆ & MARINOVIĆ, 2016). So induzieren sie beispielsweise die Ausschüttung von IL-17, IL-22 oder des juckreizfördernden Zytokins IL-31. Außerdem können Superantigene die T-Zellen unabhängig von ihrer Antigen-Spezifität aktivieren, indem sie ohne vorherige Prozessierung durch antigenpräsentierende Zellen an den T-Zell-Rezeptor binden, und so zur Initiation und Aufrechterhaltung der Entzündung beitragen (LIN et al., 2007; EYERICH & NOVAK, 2013).

1.3.2. Pathogenese der caninen atopischen Dermatitis

Genau wie beim Menschen ist die canine atopische Dermatitis eine multifaktoriell bedingte Erkrankung mit einem komplexen Zusammenspiel von verschiedenen genetischen und umweltabhängigen Faktoren, welche die Immunantwort und Hautbarriere der betroffenen Tiere beeinflussen (MARSELLA et al., 2012). Die Pathogenese der atopischen Dermatitis beim Hund entspricht im Grunde der beim Menschen. Die canine AD ist aber zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht annähernd so gut erforscht wie die humane AD. Im Folgenden wird deswegen nur auf einzelne wichtige Punkte der Pathogenese eingegangen.

Grob lässt sich die Pathogenese der caninen AD wie folgt skizzieren: Die durch die Haut eingedrungenen Allergene werden von Langerhans-Zellen aufgenommen und in den regionalen Lymphknoten, den dort vorhandenen T-Lymphozyten präsentiert. In der initialen Phase beginnt, genetisch prädisponiert, eine Th2-dominierte Immunantwort mit einer Überproduktion von IL-4. Dies führt zu einer Aktivierung der B-Zellen und einem Ig-Klassenwechsel, wodurch antigenspezifische IgE-Antikörper gebildet werden. Diese antigenspezifischen IgE-Antikörper fungieren, unter anderem auf der Oberfläche der Mastzellen, als Allergen-Rezeptoren. Bei

erneutem Allergenkontakt kommt es zu einer Degranulation der Mastzellen und zu vermehrtem Einwandern von Lymphozyten in die Haut, was zu einer lokalen Entzündungsreaktion führt. Die freiwerdenden Zytokine rufen im Folgenden Juckreiz und Selbsttrauma hervor. In Verbindung mit einer Sekundärinfektion der Haut kommt es in der chronischen Phase eher zu einer Th1-dominierten Entzündung (MARSELLA et al., 2012).

Die allergenspezifischen IgE-Antikörper wurden beim Hund, ähnlich wie beim Menschen, lange Zeit als eine der Hauptkomponenten der Pathogenese angesehen. Aber auch unter Abwesenheit dieser spezifischen Antikörper können Hunde Symptome einer atopischen Dermatitis entwickeln. Dies wird als „atopic-like dermatitis“ bezeichnet. Man ist deshalb zu dem Schluss gekommen, dass IgE-Antikörper lediglich ein Puzzleteil in dem multifaktoriellen Geschehen darstellen (MARSELLA et al., 2012).

Vielmehr scheint auch beim Hund ein gestörtes Populationsverhältnis der T-Lymphozyten und ihrer Zytokine eine entscheidende Rolle zu spielen. Während in der akuten Phase eine Überexpression von Th2-Zytokinen, wie z.B. IL-4, festgestellt werden kann, herrschen in den chronischen Läsionen eher Th1-Zytokine vor (MARSELLA et al., 2012; NUTTEN, 2015). Auch die Transkription des Zytokins TSLP ist bei an AD erkrankten Hunden verändert. Es wird von den caninen Keratinozyten produziert und induziert die Reifung und Aktivierung von Mastzellen und dendritischen Zellen. Die dendritischen Zellen forcieren unter TSLP eine Th2-dominierte Immunreaktion. Im Vergleich zu gesunden Hunden ist die Transkription von TSLP in der Haut von an AD erkrankten Hunden erhöht (KLUKOWSKA-ROTZLER et al., 2013; PUCHEU-HASTON et al., 2015).

Genau wie beim Menschen ist auch bei der caninen atopischen Dermatitis die Hautbarriere gestört. Obwohl noch keine gesicherten Erkenntnisse darüber existieren, ob die verminderte Funktion ein primäres oder sekundäres Problem darstellt, ist man sich sicher, dass die Störung der Hautbarriere einen wichtigen Teil der Pathogenese der caninen AD darstellt (SANTORO et al., 2015). So konnte auch bei atopischen Hunden ein verminderter Gehalt an Ceramiden im Stratum corneum nachgewiesen werden (SHIMADA et al., 2009). Es ist jedoch noch nicht geklärt, wie genau dieser Mangel zustande kommt. Staphylokokken-Infektionen tragen aber, genau wie bei der humanen AD, durch die von den Bakterien gebildeten Ceramidase zu einer Verminderung der Ceramide bei (MARSELLA et al., 2012).

Außerdem konnten auch ultrastrukturelle Veränderungen des Stratum corneum gefunden werden. Hunde mit atopischer Dermatitis zeigten Anomalien in der Lipidlamellen-Anordnung mit erweiterten Interzellularräumen, die sich mit voranschreitender Entzündung verschlimmern (MARSELLA et al., 2012; SANTORO et al., 2015).

Beim Mensch wird der loss-of-function-Mutation im Filaggrin-Gen der Hauptanteil an der gestörten Hautbarriere zugeschrieben. Beim Hund ist die Rolle des Filaggrins in der Pathogenese noch nicht vollständig geklärt. Wood et. al (2010) konnten zwar eine Mutation im Filaggrin-Gen nachweisen, jedoch nur in einer kleinen Gruppe britischer Labradore. Weitere Hinweise darauf, dass Mutationen des Filaggrin-Gens bei Hunden vorkommen können, lieferte eine Studie von Chervet et al. (2010). Hier wurden Hautbiopsien von erkrankten und gesunden Hunden untersucht. Bei einem Großteil der erkrankten Tiere konnten Veränderungen gefunden werden, die auf Anomalien und Mutationen im Filaggrin-Gen hindeuten. Bis zum heutigen Zeitpunkt konnten jedoch noch keine eindeutigen Zusammenhänge einer Mutation im Filaggrin-Gen und der caninen atopischen Dermatitis erbracht werden. Santoro et. al vermutet beim Hund eher einen vermehrten Abbau oder verminderte Stabilität des Filaggrin als eine verminderte Synthese (SANTORO et al., 2013).

Genau wie der Mensch, scheinen auch atopische Hunde zu bakteriellen Infektionen der Haut zu neigen, welche die klinischen Symptome verschlimmern und den Kreislauf der Entzündung aufrechterhalten können (DEBOER & MARSELLA, 2001; SANTORO & RODRIGUES HOFFMANN, 2016). Ca. 66 % der allergischen Hunde leiden, laut einer Studie aus dem Jahr 2010, an rezidivierenden, bakteriellen Hautinfektionen (FAVROT et al., 2010). Auch beim Hund ist die Diversität des Mikrobioms auf der Haut bei der AD verringert (SANTORO et al., 2015). Wie oben bereits erwähnt, findet bei vielen an AD erkrankten Menschen eine Überkolonisierung mit *Staphylococcus aureus* statt (LIN et al., 2007). Beim Hund kann *S. aureus* hingegen vergleichsweise selten isoliert werden, das Hauptpathogen stellt hier *Staphylococcus pseudintermedius* dar (BRADLEY et al., 2016). Staphylokokken haften bei atopischen Hunden besser an den Korneozyten an und schädigen durch Proteasen und Ceramidasen aktiv die Hautbarriere (MCEWAN et al., 2006; MARSELLA et al., 2012). Da auch einige Stämme von *Staphylococcus pseudintermedius* in der Lage sind verschiedene Enterotoxine und

exfoliative Exotoxine zu bilden, ist anzunehmen, dass die Überkolonisierung dieselben immunologischen Mechanismen in Gang setzt wie beim Menschen (HENDRICKS et al., 2002; SANTORO et al., 2015). Über eine T-Zell-Aktivierung und folgende Zytokinausschüttung (IL-1, IL-4, IL-12, TNF- α) kommt es zur Entstehung einer allergisch bedingten Entzündungsreaktion (SANTORO et al., 2015). Zusätzlich kommt es bei atopischen Hunden auch häufig zu einer Überwucherung der Haut mit Hefepilzen, v.a. *Malassezia pachydermatis*. Malassezien gehören zur normalen Hautflora, können jedoch bei der AD als opportunistische Pathogene fungieren (DEBOER & MARSELLA, 2001; SANTORO et al., 2015). Sie tragen genau wie *Staphylococcus pseudintermedius* direkt (über Zytokininduktion) und indirekt (als eigenständiges Allergen) zur Entzündungsreaktion bei (SANTORO et al., 2015).

1.4. Klinik der caninen atopischen Dermatitis

Bereits die Definition der caninen AD, als eine entzündliche und juckende Hauterkrankung, beinhaltet zentrale klinische Aspekte der Erkrankung. Die Symptome können jedoch sehr vielfältig sein, weswegen eine Diagnosestellung schwierig sein kann (HENSEL et al., 2015). Bereits in frühen Publikationen wurde Juckreiz als Leitsymptom der caninen AD beschrieben. In den allermeisten Fällen ist Pruritus das initiale Anzeichen der Erkrankung und kann bei einigen Patienten als einziges Symptom auftreten. Der Juckreiz ist in der Regel Steroid-responsiv und tritt bevorzugt an den distalen Gliedmaßen, im Gesicht, am Bauch und an den Ohren auf (BIZIKOVA et al., 2015). Zusätzlich entwickeln die Tiere häufig eine Reihe von primären und sekundären Hautläsionen, wie beispielsweise Erythem, Papeln, Pusteln, selbst-induzierte Alopezie, Hyperpigmentation und Lichenifikation (GRIFFIN & DEBOER, 2001; BIZIKOVA et al., 2015; HENSEL et al., 2015). Durch die geschädigte Hautbarriere kann sich außerdem eine Infektion der Haut mit Bakterien oder Hefepilzen entwickeln (BIZIKOVA et al., 2015). Neben den Hautsymptomen leiden sehr viele der Patienten an einer chronischen oder rezidivierenden Otitis externa, sowie an Konjunktivitis (21-30 %) oder Rhinitis (~7 %) (GRIFFIN & DEBOER, 2001; FAVROT et al., 2010). Je nachdem welche Allergene die canine AD auslösen, können die Symptome saisonal oder asaisonal auftreten. Nicht immer kann diese Einteilung so strikt angewendet werden, denn einige Hunde mit ganzjähriger Symptomatik können deutliche saisonale Schwankungen in der Intensität der Klinik zeigen (GRIFFIN & DEBOER, 2001).

In den meisten Fällen entwickelt sich die Erkrankung im Alter zwischen sechs Monaten und drei Jahren. Untypisch ist ein Beginn der Symptomatik bei Hunden die jünger als sechs Monate oder älter als sieben Jahre sind (GRIFFIN & DEBOER, 2001). Hunde mit einer Futter-induzierten AD sind im Vergleich zu Hunden mit einer durch Umweltallergene ausgelösten atopischen Dermatitis bei Beginn der Symptomatik eher jünger oder älter (BIZIKOVA et al., 2015). In vielen Studien wurde gezeigt, dass Labrador und Golden Retriever, West Highland White Terrier, Boxer, Französische Bulldoggen, Deutsche Schäferhunde und Cocker Spaniel überdurchschnittlich häufig betroffen sind und somit als prädisponiert für die Entwicklung einer AD gelten. Da jedoch geographische Unterschiede bei der Beliebtheit oder dem genetischen Hintergrund mancher Hunderassen feststellbar sind, können diese Rasseprädispositionen regional abweichen (JAEGER et al., 2010; BIZIKOVA et al., 2015). Rüden und Hündinnen sind gleich häufig von AD betroffen (BIZIKOVA et al., 2015).

1.5. Diagnose der caninen atopischen Dermatitis

Die klinischen Symptome der caninen atopischen Dermatitis sind, wie oben beschrieben, sehr variabel und unspezifisch. Dadurch kommen eine Reihe von Differentialdiagnosen in Frage und die canine AD kann nur durch Ausschluss dieser sicher diagnostiziert werden (DEBOER & HILLIER, 2001a). Im ersten Schritt sollte eine gründliche Anamnese mit Hilfe des Besitzers erstellt und die vorhandene Hautsymptomatik durch eine ausführliche dermatologische Untersuchung evaluiert werden. Wird auf Grund dessen eine atopische Dermatitis bei dem Patienten vermutet, müssen potentielle Differentialdiagnosen (Tabelle 1) durch eine systematische Aufarbeitung ausgeschlossen werden (HENSEL et al., 2015).

Eine häufige Ursache für Juckreiz, v.a. in der hinteren Körperhälfte, ist die Flohspeichel-Allergie (flea allergy dermatitis = FAD). Um eine Beteiligung der FAD am Krankheitsbild auszuschließen, sollte man eine gründliche Flohprophylaxe mit geeigneten Antiparasitika durchführen. Ein Befall mit *Sarcoptes* oder *Cheyletiellen* kann häufig auch durch ein oberflächliches Geschabsel nicht sicher nachgewiesen werden. Auch hier sollte bei Verdacht eine diagnostische Behandlung mit Ektoparasitika erfolgen. *Demodex*-Milben lassen sich hingegen mit Hilfe eines tiefen Hautgeschabsels sehr sicher erkennen und sollten immer als mögliche Differentialdiagnose abgeklärt werden. Eine Infektion der Haut mit Bakterien oder Hefepilzen kann primär Juckreiz verursachen, tritt aber

bei Hunden mit AD häufig sekundär, als eine Folge der geschädigten Hautbarriere, auf. Bleibt der Juckreiz auch nach Behandlung der Hautinfektion bestehen, spricht dies für das Vorliegen einer allergischen Ursache. Hier tritt die Futtermittelallergie (FIAD) als wichtigste Differentialdiagnose in den Vordergrund (DEBOER & HILLIER, 2001a; HENSEL et al., 2015). Die canine AD sensu stricto ist klinisch nicht von der FIAD zu unterscheiden (PICCO et al., 2008). Um zu evaluieren wie groß der Anteil der Futtermittelallergene am Krankheitsgeschehen ist oder ob es sich um eine NFIAD handelt, muss beim Patienten eine strikte Eliminationsdiät über acht Wochen, mit anschließender Futtermittelprovokation, durchgeführt werden (KENNIS, 2006). Konnte durch die systematische Aufarbeitung keine Kontrolle des Juckreizes erreicht werden, kann die atopische Dermatitis als Ausschlussdiagnose gestellt werden (HENSEL et al., 2015). Favrot et al. haben in ihrer Studie von 2010 die klinischen Anzeichen bei Hunden mit atopischer Dermatitis charakterisiert. Laut dieser Studie konnte eine Kombination von Kriterien erarbeitet werden (Tabelle 2), welche die klinische Verdachtsdiagnose der caninen AD erlaubt. Mit einer Sensitivität von 85,4 % und einer Spezifität von 79,1 % kann bei Hunden, die fünf der acht Kriterien erfüllen, eine AD alleine anhand der klinischen Symptome vermutet werden. Die Favrot Kriterien erlauben jedoch keine Unterscheidung von NFIAD und FIAD (FAVROT et al., 2010). Bei der alleinigen Verwendung der Favrot Kriterien als „diagnostischer Test“ kann es jedoch zu Fehldiagnosen kommen, weswegen sie nur im Rahmen einer umfassenden Aufarbeitung eingesetzt werden sollten (HENSEL et al., 2015).

Häufig werden von Praktikern die sogenannten „Allergie-Tests“ zu Diagnose einer atopischen Dermatitis verwendet. Leider eignet sich weder der Intradermaltest, noch der Serum-Allergietest als Screeningtest (DEBOER & HILLIER, 2001a). Beide Tests weisen lediglich eine beschränkte Sensitivität und Spezifität auf, da auch klinisch unauffällige Tiere in beiden Tests positiv reagieren können (LIAN & HALLIWELL, 1998). Den größten Nutzen bieten diese Tests bei der Auswahl geeigneter Allergene für eine allergenspezifische Immunotherapie (siehe Abschnitt 1.6.9), die zur Therapie der caninen AD eingesetzt werden kann (DEBOER & HILLIER, 2001a).

Tabelle 1: Wichtige Differentialdiagnosen der caninen atopischen Dermatitis (DEBOER & HILLIER, 2001a; HENSEL et al., 2015)

<i>Ektoparasitäre Hauterkrankungen</i>	Flöhe
	Räude (<i>Sarcoptes scabiei</i>)
	Demodikose
	Cheyletiellose
	Trombiculose
	<i>Otodectes cyanotis</i> Infektion
<i>Allergische Hauterkrankungen</i>	Flohspichel-Dermatitis
	Futtermittelallergie
	Kontaktdermatitis
	Insektenstich-Hypersensitivität
<i>Mikrobielle Hautinfektionen</i>	Staphylokokken-Pyodermie
	Malassezien Dermatitis
<i>Neoplasie</i>	

1.6. Therapie der caninen atopischen Dermatitis

Genau wie die Klinik, ist auch die Therapie der caninen atopischen Dermatitis sehr variantenreich und meist eine Kombination aus verschiedenen Maßnahmen und Medikamenten. Die Therapie sollte individuell auf den jeweiligen Patienten und dessen Klinik abgestimmt werden, um ein optimales Ergebnis erzielen zu können (OLIVRY & SOUSA, 2001b; OLIVRY et al., 2010).

Tabelle 2: Favrot Kriterien: Die Anwendung der Favrot Kriterien hilft bei der Interpretation klinischer Symptome beim juckenden Hund. Soll der Patient mindestens fünf der acht Kriterien erfüllen, kann mit einer Sensitivität von 85,4 % und einer Spezifität von 79,1 % eine atopische Dermatitis klinisch diagnostiziert werden. Müssen sechs Kriterien erfüllt werden, steigt die Spezifität auf 88,5 %, die Sensitivität sinkt auf 58,2 %.(FAVROT et al., 2010; HENSEL et al., 2015)

<i>Kriterien</i>	<i>Verlässlichkeit</i>
1. Alter bei Beginn der Erkrankung < 3 Jahre	5 Kriterien: Sensitivität 85,4 % Spezifität 79,1 %
2. überwiegend im Haus lebender Hund	
3. Kortison-responsiver Juckreiz	
4. chronische oder wiederkehrende Hefepilz-Infektionen	
5. Vorderbeine betroffen	
6. Pinnae betroffen	6 Kriterien: Sensitivität 58,2 % Spezifität 88,5 %
7. Ohrränder nicht betroffen	
8. Dorso-lumbaler Bereich nicht betroffen	

1.6.1. Allergenvermeidung/-reduktion

Bei Hunden mit einer atopischen Dermatitis kann durch den Kontakt mit verschiedenen Allergenen (Aeroallergene, Futtermittel- oder Arthropoden-Antigene) eine Verschlechterung der Symptomatik auftreten. Der erste Schritt in der Therapie sollte also die Vermeidung bzw. Reduktion des Kontakts zu den auslösenden Allergenen sein (OLIVRY & SOUSA, 2001b; OLIVRY et al., 2010). Besonders bei Aeroallergenen, wie Pollen oder Schimmelpilzen, gestaltet sich dies als sehr schwierig bis nahezu unmöglich. Helfen können die im Internet verfügbaren „Pollen-Radare“, diese zeigen die aktuellen Pollenkonzentrationen in den jeweiligen Gebieten an. Ist die Pollenbelastung besonders hoch, sollte der Hund möglichst wenig Zeit im Freien verbringen. Oft hilft es, den Hund nach dem Spaziergang zu waschen und mit milden Waschlotionen zu shampooieren, um die

Pollen aus dem Fell zu entfernen. Besteht beim Patienten eine Allergie gegen Hausstaubmilben-Antigene, kann die Verwendung spezieller Allergiker-Hundebetten aus Materialien mit sehr geringem Porendurchmesser, häufiges Staubsaugen oder die Reduktion von Teppichen in der Wohnung Erleichterung bringen (VAUGHAN et al., 1999; OLIVRY & SOUSA, 2001b). Durch die regelmäßige Anwendung von Akariziden wie Benzyl Benzoat im Haushalt, wird die Hausstaubmilbenbelastung gesenkt und kann zu einer Verbesserung der Klinik bei Hausstaubmilbenallergikern führen (SWINNEN & VROOM, 2004). Es wird angenommen, dass Hunde mit AD prädisponiert für die Entwicklung einer Flohspeichel-Dermatitis sind (HILLIER & GRIFFIN, 2001a). In Gebieten in denen Flöhe endemisch vorkommen, sollte bei jedem Patienten deshalb eine ganzjährige Flohprophylaxe angewendet werden (CARLOTTI & JACOBS, 2000; OLIVRY et al., 2010). Ist eine FIAD der Auslöser der Symptomatik, sollte der Hund eine geeignete Diät bekommen, um eine Verschlimmerung der Klinik durch Futtermittel-Allergene zu vermeiden (DEBOER & HILLIER, 2001a; OLIVRY et al., 2010).

1.6.2. Antibakterielle/Antimykotische Therapie

Wie oben diskutiert, sind rezidivierende Haut- und Ohrinfektion bei Hunden mit atopischer Dermatitis ein häufiges Problem. Auch wenn noch nicht abschließend geklärt ist inwieweit sie eine Folge oder ein Teil der Pathogenese der AD sind, ist man sich einig, dass ihre Behandlung einen entscheidenden Teil des therapeutischen Managements der caninen AD darstellt (DEBOER & MARSELLA, 2001). Zeigen sich klinische und zytologische Anzeichen einer Infektion mit Bakterien oder Hefepilzen, ist eine lokale und/oder systemische Therapie der Infektion angezeigt (OLIVRY et al., 2010).

Sind die Läsionen lokal begrenzt, mild oder im Anfangsstadium kann eine lokale Therapie ausreichen (HILLIER et al., 2014). Hierfür eignen sich Shampoos oder Lösungen mit antibakteriellen (Chlorhexidin, Benzyl-Peroxid, Ethyl-Lactat) oder antimykotischen (Ketoconazol, Miconazol) Inhaltsstoffen bzw. bei kleineren Läsionen auch Salben, Cremes, Gels oder Tücher mit genannten Inhaltsstoffen (MUELLER et al., 2012; HILLIER et al., 2014). Es ist zu beachten, dass lokale Pharmazeutika nur bei richtiger Anwendung uneingeschränkt wirken können. So sollte beispielsweise das Haarkleid an den betroffenen Stellen möglichst kurzgehalten werden, eine ausreichend lange Einwirkzeit (> 10 Minuten)

gewährleistet sein und auch eine ausreichend lange Therapiedauer (bis zur negativen Zytologie) eingehalten werden. Auf Grund der hohen lokalen Konzentration von Wirkstoffen, ist eine Resistenzentwicklung gegenüber topischen Antiseptika/Antibiotika seltener und eine bakterizide Wirkung tritt in den meisten Fällen auch gegenüber methicillin-resistenten Staphylokokken ein (HILLIER et al., 2014).

Bei großflächigen und massiven Läsionen ist die Anwendung systemischer Antibiotika oder Antimykotika nicht zu vermeiden (HILLIER et al., 2014). Auf Grund der zunehmenden Resistenzentwicklung sollte sich der behandelnde Tierarzt bei der Anwendung systemischer Antibiotika an den aktuellen „Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antibakteriell wirksamen Tierarzneimitteln“ orientieren (OLIVRY et al., 2010).

1.6.3. Shampoos

Durch die regelmäßige Anwendung nicht-irritierender Shampoos kann der Juckreiz bei atopischen Hunden vermindert werden. In einer Studie von 2007 konnte durch das wöchentliche Baden mit einem Shampoo ein positiver Effekt auf den Juckreiz nachgewiesen werden. Der Juckreiz konnte innerhalb von 24 Stunden bei 25 % der behandelten Hunde um die Hälfte reduziert werden (LOFLATH et al., 2007; OLIVRY et al., 2010).

1.6.4. Essentielle Fettsäuren

Essentielle Fettsäuren (essential fatty acids = EFA) können in Omega-3 und Omega-6 Fettsäuren eingeteilt werden und können vom Körper nicht selbst synthetisiert werden. Sie müssen daher dem Körper von außen zugeführt werden. Gut zur Supplementierung eignen sich beispielsweise Leinsamenöl, Fischöl, Sonnenblumenöl oder Nachtkerzenöl, da diese einen hohen Gehalt an essentiellen Fettsäuren aufweisen. Auf Grund ihrer antiinflammatorischen und immunmodulatorischen Eigenschaften werden EFAs gerne zur unterstützenden Therapie bei der caninen atopischen Dermatitis eingesetzt (BLASKOVIC et al., 2014). Die Eicosapentaensäure (EPA, Omega-3) und Dihomogammalinolensäure (DHGLA, Omega-6) konkurrieren mit der Arachidonsäure im Körper als Substrat für Enzyme, welche die EFAs in Prostaglandine und Leukotriene umwandeln. Aus der Arachidonsäure werden proinflammatorische Prostaglandine und Leukotriene synthetisiert, wohingegen aus DHGLA und EPA Eicosanoide mit eher

antiinflammatorischen Eigenschaften gebildet werden. Steht dem Körper also mehr DHGLA und EPA zur Verfügung, kommt es zu einem Anstieg der antiinflammatorischen Eicosanoide und einer mildereren Entzündungsreaktion (GALLAI et al., 1995; MUELLER et al., 2004). Zusätzlich reduzieren EFAs die Sekretion anderer proinflammatorischer Zytokine (z.B. TNF, IL-1, IL-6). Omega-6 Fettsäuren werden außerdem in epidermale interzelluläre Lipide eingebaut und stärken so die Hautbarriere und vermindern den transepidermalen Feuchtigkeitsverlust (OLIVRY et al., 2001a). In Studien konnte gezeigt werden, dass durch die orale oder topische Substitution von essentiellen Fettsäuren eine deutliche Verbesserung des Pruritus und der Hautläsionen bei der caninen AD erreicht werden können. Da bei der Anwendung von EFAs so gut wie keine Nebenwirkungen (selten Flatulenz, Erbrechen, Durchfall) zu erwarten sind, eignen sie sich hervorragend zu einer unterstützenden Therapie der AD und können zu einer Reduktion anderer Medikamente, wie Kortison oder Ciclosporin, führen (MUELLER et al., 2004; SÆVIK et al., 2004; BLASKOVIC et al., 2014; MÜLLER et al., 2016).

1.6.5. Antihistaminika

Antihistaminika wirken als Antagonist des Histamins an den spezifischen Histamin-Rezeptoren unterschiedlicher Gewebe. Der H₁-Rezeptor ist beispielsweise assoziiert mit Histamin-induziertem Juckreiz und durch die Blockade des Rezeptors durch Antihistaminika erwartet man eine Reduktion des Pruritus. Des Weiteren können Antihistaminika die Freisetzung der proinflammatorischen Mediatoren aus Mastzellen und basophilen Granulozyten hemmen (DEBOER & GRIFFIN, 2001). Auf Grund dieser Eigenschaften werden Antihistaminika häufig in der Therapie der caninen AD eingesetzt. Ihre Wirksamkeit ist jedoch nur eingeschränkt und mild, was zu der Annahme verleitet, dass Histamin keine Hauptrolle bei der Entstehung von Juckreiz und Entzündung in der Pathogenese der AD spielt (SARIDOMICHELAKIS & OLIVRY, 2016). Die Wirkung variiert stark von Hund zu Hund und auch zwischen verschiedenen Antihistaminika, weswegen bei einem Patienten unterschiedliche Präparate getestet werden sollten. Antihistaminika eignen sich nicht zur Therapie akuter Schübe, da ihre Wirkung erst nach etwa 7-14 Tagen eintritt (DEBOER & GRIFFIN, 2001). Trotz ihres eher geringen Effekts eignen sich Antihistaminika, nicht zuletzt auch auf Grund ihrer guten Verträglichkeit und geringen Nebenwirkungen (v.a.

Sedation), zur unterstützenden Therapie der caninen AD und zur Reduktion anderer Medikamente wie Kortison oder Ciclosporin (DEBOER & GRIFFIN, 2001; EICHENSEER et al., 2013; OLIVRY et al., 2015).

1.6.6. Glukokortikoide

Systemische Glukokortikoide werden sehr häufig zur symptomatischen Therapie der caninen atopischen Dermatitis eingesetzt und gelten als Standardtherapie. Durch ihre starken immunsuppressiven und antiinflammatorischen Eigenschaften mildern sie effektiv die Allergie-induzierten Symptome wie Juckreiz und entzündliche Hautläsionen (OLIVRY & SOUSA, 2001a; STEFFAN et al., 2003; GADEYNE et al., 2014). Glukokortikoide zeichnen sich außerdem durch einen schnellen Wirkungseintritt nach etwa vier Stunden aus (GADEYNE et al., 2014). Obwohl Glukokortikoide effektiv wirken, treten bei Langzeitanwendungen vielfach Nebenwirkungen auf. Zu den häufigsten zählen Polyurie, Polydipsie, Muskelatrophie, Hautatrophie, Polyphagie und Gewichtszunahme. Durch die Immunsuppression sind die Patienten außerdem prädisponiert für opportunistische Infektionen, Demodikose oder rezidivierende, bakterielle Zystitiden (OLIVRY et al., 2003). Deshalb sollte bei einer Langzeittherapie das Nutzen-Risiko-Verhältnis abgewogen und möglichst auf die niedrigste, noch wirksame Dosis reduziert oder auf Alternativmedikamente ausgewichen werden (OLIVRY et al., 2010; SARIDOMICHELAKIS & OLIVRY, 2016). Auf Grund der potentiellen Nebenwirkungen wird der Einsatz von kurz wirksamen, oralen Glukokortikoiden, wie Prednisolon oder Methylprednisolon, empfohlen. Vom Einsatz langwirksamer, injizierbarer Glukokortikoide sollte Abstand genommen werden (OLIVRY et al., 2010).

Bei lokalisiertem Pruritus und Entzündungen können glukokortikoid-haltige Sprays oder Salben anstatt einer systemischen Therapie eingesetzt werden. Die häufigsten Nebenwirkungen bei Langzeitanwendung sind kutane Atrophie, Komedonen und folliculäre Zysten (OLIVRY et al., 2010). Um das Risiko für das Auftreten systemischer Nebenwirkungen zu vermeiden, kann auf Mittel mit Hydrokortisonaceponat ausgewichen werden. Diese neuen Glukokortikoid-Formulierungen werden in der Haut in inaktive Metabolite verstoffwechselt (OLIVRY et al., 2010; SARIDOMICHELAKIS & OLIVRY, 2016).

1.6.7. Calcineurininhibitoren

Der Calcineurininhibitor Ciclosporin verhindert die T-Zell Aktivierung und damit die Produktion von wichtigen proinflammatorischen Zytokinen (v.a. IL-2). Mit seinen starken immunosuppressiven und immunmodulatorischen Eigenschaften stellt es ein potentes Medikament zur symptomatischen Therapie der caninen AD dar (FORSYTHE & PATERSON, 2014). Ciclosporin mildert ebenso effektiv den Juckreiz und AD-assoziierte Hautläsionen wie Glukokortikoide, eignet sich aber auf Grund der mildereren Nebenwirkungen besser für eine Langzeittherapie (STEFFAN et al., 2003; SARIDOMICHELAKIS & OLIVRY, 2016). Als häufigste Nebenwirkungen treten gastrointestinale Symptome auf, die aber in der Regel nach kurzer Zeit selbstlimitierend sind. Aufgrund der immunmodulatorischen Eigenschaften muss aber auch mit einer erhöhten Anfälligkeit für opportunistische Infektionen gerechnet werden (STEFFAN et al., 2005; NUTTALL et al., 2014). Der volle therapeutische Effekt von Ciclosporin tritt in der Regel erst nach ca. 4 Wochen ein. Nachdem eine deutliche Besserung der Symptome eingetreten ist, sollte versucht werden die Dosis zu reduzieren und die Therapie durch andere Ciclosporin-sparende Medikamente wie Antihistaminika oder essentielle Fettsäuren zu ergänzen (OLIVRY et al., 2010; FORSYTHE & PATERSON, 2014).

Als Alternative zur systemischen Therapie kann bei lokalen Entzündungsreaktionen oder Juckreiz der topische Calcineurininhibitor Tacrolimus angewendet werden (SARIDOMICHELAKIS & OLIVRY, 2016). Im Gegensatz zu den meisten kortikosteroidhaltigen Präparaten führt Tacrolimus nicht zu einer kutanen Atrophie, zeigt aber die gleiche Wirksamkeit. Bei manchen Patienten kann es nach dem Auftragen zu vorübergehendem Brennen auf der Haut und Juckreiz kommen. Diese Nebenwirkungen verschwinden jedoch nach mehrmaligem Auftragen spontan (BENSIGNOR & OLIVRY, 2005; MARSELLA, 2005).

1.6.8. Oclacitinib

Oclacitinib (Apoquel[®], Zoetis Inc., Florham Park, NJ, USA) ist ein relativ neues Medikament zur symptomatischen Therapie der caninen AD. Hierbei handelt es sich um einen Januskinase-Inhibitor. Viele proinflammatorische Zytokine, wie IL-2, IL-6, IL-13 oder das juckreizinduzierenden IL-31, nutzen einen Januskinase-abhängigen Signalweg in der Zelle. Durch Oclacitinib wird diese Signalübertragung blockiert und der Effekt der Zytokine inhibiert (GONZALES et al., 2014). Oclacitinib zeigte in Studien einen stark juckreizhemmenden Effekt und

fürte zur einer deutlichen Verbesserung der klinischen Symptome der AD (COSGROVE et al., 2013; LITTLE et al., 2015). Apoquel[®] eignet sich auf Grund des schnellen Wirkeintritts (~ 4 Stunden) nicht nur zur Langzeitbehandlung, sondern auch zur Behandlung akuter Schübe der AD (GADEYNE et al., 2014; SARIDOMICHELAKIS & OLIVRY, 2016). In Studien wurden nur selten Nebenwirkungen beobachtet. Zu den häufigsten gehörten Anorexie, Erbrechen und Durchfall. Da Oclacitinib durch die Januskinase-Inhibition auch Einfluss auf die Entwicklung, Differenzierung und Funktion verschiedener Leukozytenpopulationen hat, besteht bei einer Langzeitbehandlung das Risiko von Dermatophyosen und bakteriellen oder parasitären Infektionen (COSGROVE et al., 2013; LITTLE et al., 2015).

1.6.9. Allergen-Immunotherapie

Bei der Allergen-Immunotherapie (allergen immunotherapy = AIT, früher allergen-specific immunotherapy = ASIT) werden dem Patienten graduell ansteigende Dosierungen eines individuellen Allergenextraktes verabreicht. Die AIT, früher auch Desensibilisierung oder Hyposensibilisierung genannt, stellt bisher die einzige ursächliche Therapie der caninen atopischen Dermatitis dar (GRIFFIN & HILLIER, 2001).

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Medikamenten bekämpft die AIT nicht nur die Symptome, sondern moduliert das Immunsystem, sodass der Verlauf der Erkrankung langfristig verändert und die Entstehung weiterer Sensibilisierungen unterdrückt wird (GRIFFIN & HILLIER, 2001; LARCHE et al., 2006; SARIDOMICHELAKIS & OLIVRY, 2016). Der genaue Mechanismus der Immunotherapie ist bislang noch nicht vollständig aufgeklärt. In der Humanmedizin ist die AIT deutlich besser erforscht als in der Veterinärmedizin. Beim Menschen kommt es durch die Immunotherapie zu einer modifizierten Immunantwort der APCs, T-Zellen und B-Zellen auf einen Allergenkontakt. Außerdem verändert sich die Anzahl und Funktion von Effektorzellen (LARCHE et al., 2006). Beispielsweise konnte unter AIT ein Anstieg des allergen-induzierten Verhältnisses von Th1- zu Th2-Zytokinen, eine vermehrte Produktion von regulatorischen Zytokinen wie IL-10 und TGF- β und der Anstieg von regulatorischen T-Zellen beobachtet werden (EBNER et al., 1997; JUTEL et al., 2003; KEPPEL et al., 2008; LOEWENSTEIN & MUELLER, 2009). Bei Patienten mit AIT konnten zudem eine Zunahme der IgG-Antikörper gemessen werden.

Diese konkurrieren mit den IgE um die Bindung des Allergens. Sie wirken somit als blockierende Antikörper und reduzieren die IgE-mediierte Mastzell- und Basophilendegranulation. Auch beim Hund konnte ein Anstieg der IgG-Antikörper, sowie der Treg- und IL-10 Konzentrationen gemessen werden. Durch den Anstieg des Verhältnisses von IFN- γ (Interferon gamma) zu IL-4 vermutet man, dass die AIT auch beim Tier einen Shift zur Th1-dominierten Immunreaktion auslöst (LOEWENSTEIN & MUELLER, 2009).

Wie bereits erwähnt, werden dem Patienten bei der AIT Allergenextrakte verabreicht. Diese werden beim Hund in der Regel subkutan injiziert (GRIFFIN & HILLIER, 2001). Einzelne Studien zeigten aber auch Erfolge mit oraler oder intralymphatischer Applikation (DEBOER et al., 2016; FISCHER et al., 2016). Die Allergen-Lösungen werden in der Initialisierungsphase über mehrere Wochen in aufsteigender Dosis, bis zum Erreichen einer Erhaltungsdosis, verabreicht. Diese Erhaltungsdosis wird dem Hund in der Regel lebenslanglich injiziert (SARIDOMICHELAKIS & OLIVRY, 2016). Intervall und Dosis müssen regelmäßig evaluiert und bei jedem Patienten individuell angepasst werden. Eine Alternative zur klassischen Initialisierungsphase, die wie erwähnt mehrere Wochen dauert, stellt die sogenannte Rush-Immunotherapie dar. Hierbei wird dem Patienten alle 30-60 Minuten die Allergenlösung in aufsteigender Dosierung injiziert. Damit kann die Initialisierungsphase auf einen Tag verkürzt werden. Studien haben gezeigt, dass die Rush-Immunotherapie eine sichere und effiziente Therapiemöglichkeit darstellt (MUELLER & BETTENAY, 2001; HOBI & MUELLER, 2014).

Die Auswahl der Allergene die für die AIT-Injektionslösungen verwendet werden, sollte für jeden Patienten individuell erfolgen. Nach der Durchführung eines Intrakutan- oder Serum-Allergietests werden, unter Berücksichtigung der klinischen Historie des Patienten, die relevanten Allergene ausgewählt. Werden unspezifische Allergenlösungen für die AIT verwendet, zeigen die Patienten ein schlechteres Ansprechen als bei spezifisch ausgewählten Allergenextrakten. Die Auswahl der richtigen Allergene durch einen geeigneten Test scheint also essentiell für den Erfolg der AIT (LOEWENSTEIN & MUELLER, 2009).

Die AIT ist eine gut verträgliche Therapie. Die häufigste Nebenwirkung ist das Auftreten von verstärktem Juckreiz und eine Verschlimmerung der klinischen Symptome. Diese Reaktion tritt in der Regel kurz nach der Injektion ein und kann

Stunden bis Tage anhalten (GRIFFIN & HILLIER, 2001). In diesem Fall kann eine Anpassung des Therapieprotokolls zur Milderung der Nebenwirkungen führen. Bei etwa 1 % der behandelten Hunde kommt es zu systemischen Nebenwirkungen. Dazu zählen unter anderem Schwäche, Depression, Schlaflosigkeit, Hecheln, Durchfall, Erbrechen, Urtikaria und im schlimmsten Fall Kollaps und Anaphylaxie (LOEWENSTEIN & MUELLER, 2009).

Die AIT gilt auf Grund von Studien und Erfahrungsberichten als effektive Therapiemöglichkeit der caninen AD. Die meisten Studien zur Wirksamkeit der AIT sind offene, nicht kontrollierte Studien und es gibt nur wenige kontrollierte, randomisierte Studien die diese Thematik überprüft haben. Die meisten Studien geben für die AIT eine Wirksamkeit von 52 bis 77 % an. Die Wirksamkeit wurde in diesen Studien über ähnliche Kriterien evaluiert (z.B. Verbesserung der klinischen Symptome um mehr als 50 %) (LOEWENSTEIN & MUELLER, 2009). In der einzigen publizierten, Placebo-kontrollierten Doppelblindstudie aus dem Jahr 1984 zeigten 59 % der Hunde in der AIT-Gruppe eine Verbesserung um mehr als 51 % der klinischen Symptome. In der Placebo-Gruppe verbesserten sich nur 21 % der Hunde um den gleichen Wert (WILLEMSE et al., 1984). Wie schnell die Patienten auf die Immunotherapie ansprechen ist sehr individuell. In Studien gibt es dazu sehr unterschiedliche Angaben. Einige Autoren beschreiben ein Ansprechen bereits nach zwei bis fünf Monaten, bei anderen stellten sich die Erfolge der AIT erst nach ca. acht bis neun Monaten ein (ZUR et al., 2002; SCHNABL et al., 2006). Es wird empfohlen die Immunotherapie mindestens ein Jahr lang durchzuführen, bevor über ihre Wirksamkeit abschließend beurteilt wird (OLIVRY et al., 2010).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die allergen-spezifische Immunotherapie eine sichere und erfolgversprechende, ursächliche Therapie der caninen AD ist. Sie sollte bei jedem Patienten mit einer AD sensu stricto in Erwägung gezogen werden, bei dem durch einen Allergietest die auslösenden Allergene identifiziert werden konnten (LOEWENSTEIN & MUELLER, 2009).

2. Allergietest beim Hund

Wie bereits erwähnt, kann sich die Diagnose der caninen atopischen Dermatitis schwierig gestalten. Sie kann derzeit lediglich als Ausschlussdiagnose gestellt werden. Mit Intradermal- oder Serumallergietest (SAT) werden momentan in der

Tiermedizin zwei vermeintliche Allergietesttypen für den Hund angeboten. Leider eignet sich keiner dieser Tests als Screeningtest zur Diagnosestellung, da auch immer wieder gesunde, nicht atopische Hunde positive Testergebnisse zeigen bzw. Patienten mit diagnostizierter AD negative Testergebnisse haben können. Die beiden Tests sind somit lediglich zur Auswahl der relevanten Allergene für eine allergenspezifische Immunotherapie geeignet (HENSEL et al., 2015). Im Folgenden sollen diese beiden Testmethoden näher beleuchtet werden.

2.1. Serumallergietest

Seit den 80er Jahren sind Serumallergietests kommerziell verfügbar und werden seitdem häufig eingesetzt (SÆVIK et al., 2003). Wie bereits erwähnt, spielen IgE-Antikörper auch eine Rolle in der Pathogenese der atopischen Dermatitis. Durch den Test sollen die im Serum zirkulierenden IgE-Antikörper gemessen werden. In der Humanmedizin sind sowohl Tests zur Messung des totalen Serum-IgE-Gehalts als auch zur Quantifizierung der allergen-spezifischen IgE-Antikörper verfügbar (DEBOER & HILLIER, 2001b). Der Gesamt-IgE-Gehalt im Serum adulter Hunde mit AD weicht, ähnlich wie beim Menschen, kaum von dem Wert gesunder Hunde ab (HILL et al., 1995). Es wird vermutet, dass viele Faktoren, wie beispielsweise unterschiedliche Impf- und Entwurmungsprotokolle, aber auch genetische Komponenten den IgE-Gehalt beeinflussen können und eine Messung des Gesamt-IgE-Gehalts beim Hund somit kein nützliches Werkzeug zur Diagnose der AD darstellt. Beim Menschen kann mithilfe des Gesamt-IgEs im Serum eine Vorhersage getroffen werden, ob ein Kind prädisponiert für die Entwicklung einer AD ist. Bisher konnten in der Tiermedizin keine vergleichbaren Korrelationen bei Welpen nachgewiesen werden. Somit macht beim Hund ausschließlich die Messung der allergen-spezifischen IgE-Antikörper Sinn (DEBOER & HILLIER, 2001b).

Bei der Messung allergen-spezifischer IgE-Antikörper werden nur die IgE-Moleküle identifiziert, die gegen ein spezielles Allergen gerichtet sind und als klinisch relevant angesehen werden (HENSEL et al., 2015). Das Grundprinzip des Serumallergietests ist in den meisten Fällen ein Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) oder Radio-Allergo-Sorbent-Test (RAST) und funktioniert wie folgt: Zuerst lässt man das Patientenserum mit einem individuellen Allergenextrakt reagieren, welches in den meisten Fällen an ein festes Medium gebunden ist. Im nächsten Schritt werden die ungebundenen Komponenten abgewaschen, sodass

lediglich die an das Allergen gebundenen Antikörper übrigbleiben. Diese Antikörper werden nun mit Hilfe eines Anti-IgE-Reagenz detektiert, welches zuvor an ein Enzym (ELISA) oder Radioisotop (RAST) gekoppelt wurde. Durch die Reaktion des Enzyms bzw. Radioisotops kann mittels Kolorimetrie, Radiometrie oder Fluorometrie indirekt eine Messung des gebundenen IgEs durchgeführt werden (DEBOER & HILLIER, 2001b).

Als Anti-IgE-Reagenz wurden lange Zeit polyklonale oder monoklonale anti-canine IgE-Antikörper verwendet (HENSEL et al., 2015). Die monoklonalen Antikörper weisen eine höhere Sensitivität und Spezifität gegenüber den caninen IgE-Antikörper auf als die polyklonalen Antikörper (DÉRER et al., 1998). Aus diesem Grund nimmt die Verwendung von Testverfahren mit polyklonalen anti-caninen IgE-Antikörper zunehmend ab (HENSEL et al., 2015). Die poly- und monoklonalen Antikörper binden jedoch nicht nur IgE, sondern können auch an die im Serum in großer Anzahl vorhandenen IgG-Antikörper binden. Dadurch können falsch-positive Reaktionen entstehen und somit die Spezifität des Tests limitieren (WASSOM et al., 1998). Durch die Verwendung eines rekombinant hergestellten Fragmentes des extrazellulären Anteils der humanen, hoch-affinen IgE-Rezeptor-Alpha-Untereinheit (FcεRIα) als Detektor, kann die Sensitivität erhöht werden (DEBOER & HILLIER, 2001b). FcεRI ist ein auf den Mastzellen und basophilen Granulozyten befindlicher hochaffiner Rezeptor für IgE-Antikörper. Der extrazelluläre Anteil (alpha-Kette) bildet eine spezifische Bindungsstelle für den Fc (fragment crystallizable)-Teil eines IgE-Moleküls. Die Bindung eines Antigens an zwei Rezeptor-gebundene IgE-Moleküle auf der Zelloberfläche führt zur Degranulation der Mastzelle. Die Reaktion von IgE mit FcεRIα ist also hoch spezifisch und keine andere Immunglobulinklasse bindet an diesen Rezeptor (WASSOM et al., 1998). Durch die fehlende Kreuzreaktivität mit IgG, eignet sich FcεRIα zur Messung von allergen-spezifischem IgE mittels ELISA, auch bei Hunden mit einem hohen Serum-Gehalt an allergen-spezifischem IgG (WASSOM et al., 1998; STEDMAN et al., 2001).

Die Qualität des Tests ist von Labor zu Labor sehr unterschiedlich, was durch verschieden Faktoren bedingt ist. Labore, die einen Serumallergietest kommerziell anbieten, beziehen beispielsweise ihre Allergenextrakte aus unterschiedlichen Quellen (DEBOER & HILLIER, 2001b). Die Allergen-Gehalte im Extrakt können bei verschiedenen Manufakturen erheblich variieren. Die Unterschiede können so

extrem sein, dass der gleiche Patient unterschiedliche Testergebnisse, abhängig vom verwendeten Extrakt, produziert (TURNER et al., 1980). Aus diesem Grund verwenden humanmedizinische Labore größtenteils standardisierte Allergen-Extrakte bzw. rekombinant hergestellte Allergen-Epitope (DEBOER & HILLIER, 2001b).

Die in der Tiermedizin kommerziell verfügbaren Serumallergietests liefern keine quantitative Analyse der im Serum vorhandenen IgE-Antikörper mit Angabe in einer quantitativen Einheit, wie z.B. ng/ml. Vielmehr handelt es sich um eine semi-quantitative Analyse, bei der das abgegebene Signal in ein Score-System umgewandelt wird. Diese Umwandlung erfolgt durch den Vergleich mit Referenzproben. Somit können Ergebnisse unterschiedlicher Labore nicht verglichen werden, da die semi-quantitative Analyse abhängig von der im Labor verwendeten Referenzprobe erfolgt (DEBOER & HILLIER, 2001b).

Der Serumallergietest wird in der Praxis häufig angeboten, da er mit wenig Aufwand für Tierarzt und Patient durchgeführt werden kann. Da für die Gewinnung des Probenmaterials (Serum) lediglich eine Blutabnahme nötig ist, handelt es sich bei einem SAT um eine wenig invasive Testmethode. Im Gegensatz zum Intradermaltest muss der Hund zur Durchführung nicht sediert und großflächig rasiert werden. Außerdem scheinen die Ergebnisse des Serumallergietests nicht so sehr durch Medikamente beeinflussbar zu sein, wie beim Intradermaltest (siehe Abschnitt 2.5) (REES, 2001). Dadurch wird die Bereitschaft der Tierbesitzer zur Durchführung eines Allergietests gesteigert.

2.2. Intradermaltest

Der Intradermaltest gilt in der Tiermedizin derzeit als „Goldstandard“ zur Feststellung der allergieauslösenden Allergene und wird von den meisten Dermatologen gegenüber dem Serumallergietest präferiert (HENSEL et al., 2015; POPIEL & CEKIERA, 2015). Beim Intradermaltest kommt es, in Folge der intradermalen Injektion von Allergenen, zu einer IgE-abhängigen Degranulation kutaner Mastzellen (Typ-1-Hypersensitivitätsreaktion) (HILLIER & DEBOER, 2001). Die dadurch hervorgerufenen Hautreaktionen (Rötung, Schwellung) erlauben eine indirekte Messung der kutanen Mastzell-Reaktivität aufgrund des Vorhandenseins von allergenspezifischen IgE-Antikörpern. Genau wie der Serumallergietest, ist auch der Intradermaltest nicht zur Diagnose einer Allergie

geeignet (HENSEL et al., 2015).

Die Durchführung eines Intradermaltests ist deutlich aufwändiger als die eines Serumallergietests. Um eine exakte intradermale Injektion der Allergene zu gewährleisten, sollte der Testbereich großflächig ausgeschoren werden, manche Patienten benötigen eine Sedation. Als Injektionsfeld wird in der Regel die seitliche Thoraxwand gewählt. Es muss darauf geachtet werden, dass sich in diesem Bereich keine allergiebedingten Hautläsionen befinden, da sonst die Auswertung des Tests schwerer fällt (HENSEL et al., 2015). Zuerst werden eine Positiv- und eine Negativkontrolle injiziert, um die Reaktionen auf die Allergene einteilen zu können. In der Regel wird als Positivkontrolle Histamin-Phosphat in einer Konzentration von 1:100 000 bis 1:10 000 w/v (weight per volume) verwendet. Es wurde gezeigt, dass eine Konzentration von 1:10 000 w/v konstantere Positiv-Reaktionen hervorruft und so weniger Allergene als falsch positiv bewertet werden (HENSEL et al., 2004). Als Negativ-Kontrolle sollte die in den Allergenextrakten verwendete Verdünnungslösung benutzt werden. Die Allergene und die Kontrolllösungen werden mit Hilfe einer Tuberkulinspritze oder 1,0 ml-Spritze mit einer 0,5 bis 0,75 mm großen Nadel injiziert. In der Regel wird ein Volumen von 0,05 ml bis 0,1 ml der Lösungen injiziert. Bei richtiger Injektionstechnik bildet sich in der Haut eine helle Blase (HILLIER & DEBOER, 2001). Die Reaktionen werden nach ca. 15 bis 20 min abgelesen (HENSEL et al., 2015). Genau wie beim Menschen treten auch beim Hund IgE-medierte Spätreaktionen (Typ-IV-Hypersensitivitätsreaktionen) nach der intradermalen Injektion von Allergenen auf (OLIVRY et al., 2001b). Die klinische Relevanz dieser Reaktionen ist bis jetzt noch nicht geklärt (HILLIER & DEBOER, 2001).

Die Reaktionen können nach einem subjektiven und/oder objektiven Verfahren abgelesen werden. Die subjektive Beurteilung erfolgt auf Grundlage visueller und taktiler Bewertung von Durchmesser, Rötung und Konsistenz der entstandenen Quaddeln. Beim objektiven Verfahren wird lediglich der Quaddeldurchmesser in Millimeter gemessen (HUBBARD & WHITE, 2011). Die Reaktionen der Allergene werden mit der Positiv- und Negativkontrolle verglichen und beim subjektiven Verfahren mit den Werten 0, 1, 2, 3 oder 4 bewertet. Mit 0 wird eine Reaktion bewertet, die der Negativkontrolle entspricht, mit 4 eine Reaktion ähnlich der Positivkontrolle. Als klinisch relevant und damit positiv, werden Reaktionen ≥ 2 gewertet. Beim objektiven Verfahren gilt eine Reaktion als positiv, wenn der

Quaddeldurchmesser gleich oder größer dem Mittelwert von Positiv- und Negativkontrolle ist (HILLIER & DEBOER, 2001). Beide Verfahren haben sowohl Vor- als auch Nachteile. Für einen unerfahrenen Tierarzt ist z.B. die objektive Beurteilung deutlich einfacher durchzuführen, da hierfür keine große Erfahrung notwendig ist. Die bei der subjektiven Beurteilung mit einbezogenen Parameter Rötung und Konsistenz erlauben hingegen eine akkuratere Einschätzung der Reaktionen (HUBBARD & WHITE, 2011). Hubbard et al. (2011) kommen zu der Einschätzung, dass eine Kombination der beiden Verfahren die exakteste Auswertung eines Intradermaltests erlaubt. Die meisten Dermatologen verwenden das subjektive Verfahren (DEBOER, 1989).

Genau wie beim Serumallergietest, kann es auch beim Intradermaltest zu falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnissen kommen. Der häufigste Grund stellt beim IDT die Injektionstechnik dar. Eine zu tiefe Injektion (subkutan) führt zu einer fehlenden Reaktion, bei starker Traumatisierung der Haut durch die Nadel kann es hingegen zu einer verstärkten Reaktion kommen (HILLIER & DEBOER, 2001). Falsch-positive Reaktionen können auch durch Irritationen oder eine zu hohe Allergenkonzentration hervorgerufen werden (REES, 2001). Wird hingegen eine zu niedrige Konzentration der Allergene injiziert, kommt es zu falsch-negativen Ergebnissen. Dies kann z.B. passieren, wenn die Allergenextrakte falsch gelagert werden (verdünnte Allergene können in einem Glasgefäß bis zu 8 Wochen bei 4°C gelagert werden) (HILLIER & DEBOER, 2001). Interferenzen mit pharmakologischen Substanzen können die Ergebnisse des Intradermaltests zusätzlich stark beeinflussen (siehe Abschnitt 2.5) (OLIVRY & SARIDOMICHELAKIS, 2013).

Die Qualität des IDTs wird maßgeblich durch die richtige Auswahl an Test-Allergenen beeinflusst. Der Tierarzt sollte sich über die regional vorkommenden Allergene informieren, da zum Beispiel Pollen starken geographischen Schwankungen unterliegen. Getestet werden sollten also nur Allergene, denen der Patient in seiner Umgebung tatsächlich ausgesetzt ist. Die Allergenauswahl sollte regelmäßig evaluiert werden und Allergene, die wiederholt keine Reaktionen hervorrufen, gegen andere wichtige Allergene ausgetauscht werden (HILLIER & DEBOER, 2001). Wie bereits erwähnt spielt auch die richtige Konzentration der Allergenextrakte eine wichtige Rolle. Leider gibt es in der Tiermedizin keine standardisierten Allergenextrakte und die Konzentrationen

können nur grob in weight/volume (w/v), protein nitrogen units/milliliter (PNU/ml) oder Noon units/milliliter (NU/ml) angegeben werden. Der Gehalt an Allergen kann deutlich zwischen Allergenextrakten von unterschiedlichen Herstellern, aber auch zwischen Lösungen eines Herstellers variieren (HILLIER & DEBOER, 2001).

2.3. Sensitivität und Spezifität von Intradermal- und Serumallergietest

Die Sensitivität und Spezifität von Intradermal- und Serumallergietest zu bestimmen, ist aus verschiedenen Gründen schwierig. Wie bereits oben erwähnt, kommen beim Intradermaltest sowohl falsch positive wie auch falsch negative Ergebnisse vor. Der Intradermaltest ist also weder 100 % sensitiv, noch 100 % spezifisch, eine genaue Angabe lässt sich jedoch nicht machen (HILLIER & DEBOER, 2001). Die meisten Kalkulationen von Spezifität und Sensitivität der unterschiedlichen Serumallergietests basieren jedoch darauf, dass die Ergebnisse des Intradermaltests als wahr angenommen werden. Die Angaben über Sensitivität und Spezifität des Serumallergietests müssen deshalb kritisch betrachtet werden. Ein weiteres Problem stellt eine mangelnde Standardisierung der Testverfahren dar (DEBOER & HILLIER, 2001b). Unterschiedliche Studien zu Spezifität und Sensitivität lassen sich, auf Grund der sehr unterschiedlich verwendeten Testverfahren und Allergenextrakte, kaum vergleichen und variieren deutlich (HÄMMERLING & DE WECK, 1998; WASSOM et al., 1998; DEBOER & HILLIER, 2001b; FOSTER et al., 2003). Mueller et al. verglichen in ihrer Studie die Ergebnisse eines monoklonalen ELISA-Serumtests mit den Ergebnissen des IDT von 84 Hunden mit atopischer Dermatitis. Sie geben eine Gesamtsensitivität von 90,4 % und eine Gesamtspezifität von 91,6 % für den verwendeten ELISA an (MUELLER et al., 1999). In einer Studie von Sævik et al. (2003) wurde ein polyklonaler ELISA-Test evaluiert. Dazu wurden die Ergebnisse von atopischen Hunden, juckenden aber nicht-atopischen Hunden und gesunden Hunden verglichen. Der ELISA zeigte in dieser Studie eine Spezifität von 84,4 % und eine Sensitivität von 53,6 %. Zur Kalkulation wurden die positiven ELISA-Ergebnisse in der Gruppe der gesunden Hunde, sowie in der Gruppe der juckenden, nicht-atopischen Hunde als falsch positiv gewertet. Als falsch negativ wurde es gewertet, wenn ein atopischer Hund keinerlei positive Reaktionen im Test gezeigt hat. Die vergleichsweise niedrige Sensitivität erklären die Autoren mit dem gewählten Cut-Off-Wert des ELISAs. Wird dieser höher gesetzt, steigt zwar die Spezifität, die Sensitivität nimmt jedoch ab (SÆVIK et al., 2003). Hier wird wieder

die fehlende Standardisierung und damit Vergleichbarkeit der Studienergebnisse deutlich. Selbst innerhalb eines Tests ergeben sich unterschiedliche Werte für Sensitivität und Spezifität, je nach Allergengruppe (MUELLER et al., 1999; SÆVIK et al., 2003). In einer Studie von Foster et al. variiert beispielsweise die Sensitivität zwischen 19,3 % für *Dermatophagoides farinae* (*D. farinae*) und 77,1 % für *Tyrophagus putrescentiae*. Die Spezifität variiert nicht ganz so sehr, mit Werten zwischen 64,2 % (Flöhe) und 99,3 % (*Aspergillus* spp. und *Cladosporium* spp.) (FOSTER et al., 2003). Durch die Entwicklung eines auf dem FcεR1α-basierenden ELISA-Tests, konnte die Spezifität des Serumallergietests gesteigert werden (WASSOM et al., 1998).

Intradermal- und Serumallergietest messen, wie oben ausführlich beschrieben, unterschiedliche Komponenten einer IgE-mediierten Immunantwort. Während der Hauttest die IgE-abhängige Mastzelldegranulation widerspiegelt, misst der Serumallergietest zirkulierende IgE-Antikörper. Es ist also nicht verwunderlich, dass die Ergebnisse der Tests bei vielen Patienten nur eine geringe Korrelation (zwischen 43-64 %) aufweisen. Außerdem werden in den beiden Testverfahren Allergene aus unterschiedlichen Quellen verwendet (FOSTER et al., 2003). Die häufigsten positiven Reaktionen im Intradermaltest zeigen Hunde für die Allergene *D. farinae* und *D. pteronyssinus* (STURE et al., 1995; SARIDOMICHELAKIS et al., 1999; MUELLER et al., 2000; FOSTER et al., 2003; SÆVIK et al., 2003). Auch beim Serumallergietest scheinen Milbenallergene sehr häufig positive Reaktionen zu produzieren (FOSTER et al., 2003; ROQUE et al., 2011).

2.4. Erfolg der Allergen-Immunotherapie in Abhängigkeit von Intradermaltest und Serumallergietest

Beim Hund scheint der Erfolg der AIT allergen-spezifisch zu sein. Tiere, die mit einer nicht-spezifischen Allergenlösung behandelt werden, zeigen ein deutlich geringeres Ansprechen. Die richtige Auswahl der allergieauslösenden Allergene ist deshalb sehr wichtig (LOEWENSTEIN & MUELLER, 2009). Diese können entweder mit Hilfe des Intradermaltests oder des Serumallergietests ermittelt werden. Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, ist die Korrelation von Intradermaltest und Serumallergietest häufig gering. Die Auswahl der Allergene für eine allergenspezifische Immunotherapie könnte also für ein und denselben Patienten, abhängig vom gewählten Testverfahren, sehr unterschiedlich ausfallen (SÆVIK et al., 2003). Park et al. (2000) haben in ihrer Studie bei 27 atopischen

Hunden eine allergenspezifische Immunotherapie durchgeführt. Bei 15 Hunden wurden die Allergene auf Grundlage des IDT ausgewählt, bei den restlichen zwölf Hunden auf Grundlage des SAT. Nach neun Monaten zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede bei der Verbesserung der klinischen Symptome der AD zwischen den beiden Gruppen. Zum selben Ergebnis kommt auch eine retrospektive Auswertung am Teaching Hospital der University of Davis. Bei 266 Hunden konnte auch hier kein Unterschied in den Erfolgsraten der Immunotherapie, abhängig von Serum- oder Intradermaltest, festgestellt werden (ZUR et al., 2002). Das Ansprechen auf die allergenspezifische Immunotherapie scheint also unabhängig von der gewählten Testmethode zu sein. Die größte Effizienz der AIT ließe sich vermutlich durch Zusammenstellung der Allergenlösung auf Grundlage beider Testergebnisse erreichen (GRIFFIN & HILLIER, 2001; SCHNABL et al., 2006; LOEWENSTEIN & MUELLER, 2009).

2.5. Beeinflussung durch Medikamente

Wie bereits erwähnt, können Pharmakotherapeutika die Ergebnisse von Intradermaltest und Serumallergietest verfälschen. Der Intradermaltest scheint hierdurch stärker beeinflussbar zu sein als der Serumallergietest. Im Folgenden soll auf ausgewählte Medikamente näher eingegangen werden. In Tabelle 3 wurden Empfehlungen für die Absetzzeitpunkte häufiger eingesetzter Medikamente, vor Durchführung eines IDT oder SAT, zusammengefasst.

Orale Antihistaminika werden in der Praxis häufig eingesetzt. Ihr Einfluss auf die Messung von allergenspezifischen IgE-Antikörpern im SAT ist nicht untersucht. Auf Grund ihres Wirkmechanismus dürften sie jedoch keinen Einfluss darauf haben, weshalb ein Absetzen der Antihistaminika vor einem SAT nicht unbedingt notwendig ist (OLIVRY & SARIDOMICHELAKIS, 2013). Anders stellt es sich beim Intradermaltest dar, wo es mehrere Untersuchungen zum Einflusses von oralen Antihistaminika gibt. Alle Studien konnten eine Verminderung der Reaktionen im IDT feststellen. Fünf bis sieben Tage nach Absetzen der Antihistaminika, wurden wieder normale Reaktionen beobachtet (BARBET & HALLIWELL, 1989; TEMIZEL et al., 2011). Olivry und Saridomichelakis (2013) kommen zu dem Schluss, dass orale Antihistaminika idealerweise sieben Tage vor Durchführung eines IDT abgesetzt werden sollten.

Der Effekt von Glukokortikoiden auf die Ergebnisse der Allergietests ist abhängig

von Formulierung, Dosierung, Potenz und Dauer der Verabreichung (HILLIER & DEBOER, 2001). Nicht selten werden atopische Patienten mit oralen Glukokortikoiden, wie beispielsweise Prednisolon, behandelt. Studien kommen bezüglich ihres Effekts auf die Reaktionen des IDT zu unterschiedlichen Ergebnissen. In einer Studie mit acht Flohspeichel-allergischen Beagles konnte nach fünf Wochen oraler Prednisolongabe kein suppressiver Effekt festgestellt werden (CLARKE et al., 2003). Im Gegensatz dazu konnten Hickey et al. (1993) eine signifikante Reduktion der IDT-Reaktionen, v.a. der Spätreaktionen, durch Prednisolon beobachten. Es wird auf Grund der unterschiedlichen Studienergebnisse empfohlen, orale Glukokortikoide 14 Tage vor einem Intradermaltest abzusetzen (OLIVRY & SARIDOMICHELAKIS, 2013). Bei lang wirksamen, injizierbaren Glukokortikoiden (z.B. Methylprednisolon Acetat) geht man davon aus, dass sie die Ergebnisse deutlicher beeinflussen als orale Glukokortikoide. Es gibt jedoch keine Studien, die einen optimalen Absetzzeitpunkt für Depot-Präparate ermittelt haben. Sie sollten aber mindesten 28 Tage vor einem IDT abgesetzt werden, um den Einfluss möglichst gering zu halten (CLARKE et al., 2000; OLIVRY & SARIDOMICHELAKIS, 2013). Der Serumallergietest scheint durch orales Prednisolon (HICKEY et al., 1993) oder topische Glukokortikoide nicht beeinflusst zu werden (OLIVRY & SARIDOMICHELAKIS, 2013). Über den Einfluss von injizierbaren Depot-Glukokortikoiden gibt es nur wenig Informationen. Laut einer Studie von Clarke et al. (2000) konnte einen Monat nach der letzten Injektion keine Hemmung der IgE-Titer mehr gemessen werden. Es wird davon ausgegangen, dass spätestens 28 Tage nach der Injektion eines Depot-Glukokortikoids Blut für einen SAT abgenommen werden kann (OLIVRY & SARIDOMICHELAKIS, 2013).

Laut mehreren Studien scheint Ciclosporin keinen Einfluss auf die Reaktionen im Intradermal- oder Serumallergietest zu haben (CLARKE et al., 2003; GOLDMAN et al., 2010). Wurde Ciclosporin nicht länger als zwei Monate gegeben, muss es vor Durchführung der Tests nicht abgesetzt werden (OLIVRY & SARIDOMICHELAKIS, 2013). Bei einer längerfristigen Gabe von über zwei Monaten existieren keine Daten bezüglich einer Testbeeinflussung.

In einer ersten Studie scheint eine kurzzeitige Therapie mit Oclacitinib (Apoquel®) keinen Einfluss auf die Ergebnisse von Intradermal- und Serumallergietest zu haben (ALOE et al., 2013). Zum Einfluss bei längerfristiger Gabe ist zum jetzigen

Zeitpunkt nichts bekannt und es kann keine Empfehlung zum Absetzzeitpunkt gegeben werden.

Neben den antiallergisch wirkenden Medikamenten können auch Sedativa und Anästhetika die Testresultate beeinflussen. Dazu zählen unter anderem Ketamin, Diazepam, Acepromazin und Propofol. Sie sollten nicht für eine Anästhesie während eines Intradermaltests verwendet werden (HILLIER & DEBOER, 2001).

Tabelle 3: Absetzzeitpunkt häufig verwendeter Medikamente vor Testbeginn (OLIVRY & SARIDOMICHELAKIS, 2013)

Medikament	Optimaler Absetzzeitpunkt	Minimaler Absetzzeitpunkt
<i>Intradermaltest</i>		
Antihistaminika	7 Tage	2 Tage
Kurz-wirksame, orale Glukokortikoide (Prednison, Prednisolon)	14 Tage	nicht bekannt
Injizierbare Depot-Glukokortikoide (Methylprednisolon Acetat)	nicht bekannt	28 Tage
Topische Glukokortikoide	14 Tage (hoch potent)	0 Tage (niedrig potent)
Ciclosporin	0 Tage	0 Tage
<i>Serumallergietest</i>		
Antihistaminika	nicht bekannt	0 Tage
Kurz-wirksame orale Glukokortikoide (Prednison, Prednisolon)	0 Tage	0 Tage
Injizierbare Depot-Glukokortikoide (Methylprednisolon Acetat)	< 28 Tage	nicht bekannt
Ciclosporin	0 Tage	0 Tage

3. Proteinmicroarrays in der humanen Allergiediagnostik

Microarrays wurden in den 80er Jahren als eine Art „lab-on-chip“ Plattform zur Expressionsanalyse entwickelt und werden seit den 90ern vor allem in Form von

DNA-Microarrays für die Genotypisierung eingesetzt (TEMPLIN et al., 2002; HARWANEGG & HILLER, 2005). Diese DNA-Biochips stellten sich als sehr nützliche Technologie im Feld der Genomics und Transcriptomics heraus. Man stellte jedoch fest, dass die gewonnenen Informationen über die Genexpression häufig nur wenig mit dem tatsächlichen Ausmaß und Funktion der entsprechenden Genprodukte korrelieren. Um zuverlässige Aussagen über die Proteinexpression und –funktion auf zellulärer Ebene gewinnen zu können, übertrug man das Konzept des DNA-Biochips und entwickelte die ersten Proteinmicroarrays (HARWANEGG & HILLER, 2005). Der Proteinmicroarray bietet die Möglichkeit, die Interaktion von Proteinen mit unterschiedlichen Reagenten, wie Antikörpern, Nukleinsäuren, kleinen Molekülen, Peptiden oder anderen Proteinen, zu untersuchen (GUPTA et al., 2016). Für die Allergiediagnostik wird die Reaktion der auf dem Microarray gespotteten Proteine mit den im Patientenserum enthaltenen Antikörpern untersucht. Diese Technik soll im Folgenden näher beleuchtet werden.

3.1. Prinzip des Allergen-Microarrays

Der Microarray wird in der Regel auf einem Trägermaterial mit glatter Oberfläche, wie beispielsweise einem Glas-Objektträger oder einer Silikonscheibe, durchgeführt (HARWANEGG & HILLER, 2005). Die Proteine (gereinigte oder rekombinant hergestellte Allergene) werden mittels eines automatisierten Prozesses auf die Oberfläche des Trägermaterials aufgebracht. Diesen Vorgang nennt man „spotting“. Jedes Allergen wird dabei innerhalb eines punktförmigen Bereichs (Spot) aufgetragen. Ein Testfeld kann mehrere Hundert dieser lediglich wenige µm (Mikrometer)-großen Spots mit unterschiedlichen Allergenen enthalten und ein Objektträger bis zu 12 einzelne Testfelder (siehe Abbildung 1) (HARWANEGG et al., 2003). Um die Proteine in einer stabilen und biologisch aktiven Form auf dem Trägermaterial befestigen zu können, muss dessen Oberfläche in der Regel modifiziert werden. Dies kann entweder durch chemische Modifikation oder durch Aufbringen einer 3D-artigen Auflage (Nitrocellulose- oder Hydrogel-Strukturen) erreicht werden (HARWANEGG & HILLER, 2005). Je nach verwendeter Beschichtung, binden die Proteine über hydrophobe Wechselwirkungen oder elektrostatische und kovalente Bindungen an die Trägeroberfläche (ANGENENDT et al., 2002). Im ersten Testschritt wird das Patientenserum mit den gespotteten Allergenen inkubiert und die allergen-spezifischen IgE-Antikörper binden an die jeweiligen Spots. Zur Detektion der gebundenen allergen-spezifischen

IgE-Antikörper werden fluoreszenzmarkierte Anti-IgE-Antikörper verwendet. Mittels eines Microarray-Laserscanners wird die Fluoreszenz der einzelnen Spots ausgelesen und mit Hilfe einer Software quantifiziert (HARWANEGG et al., 2003).

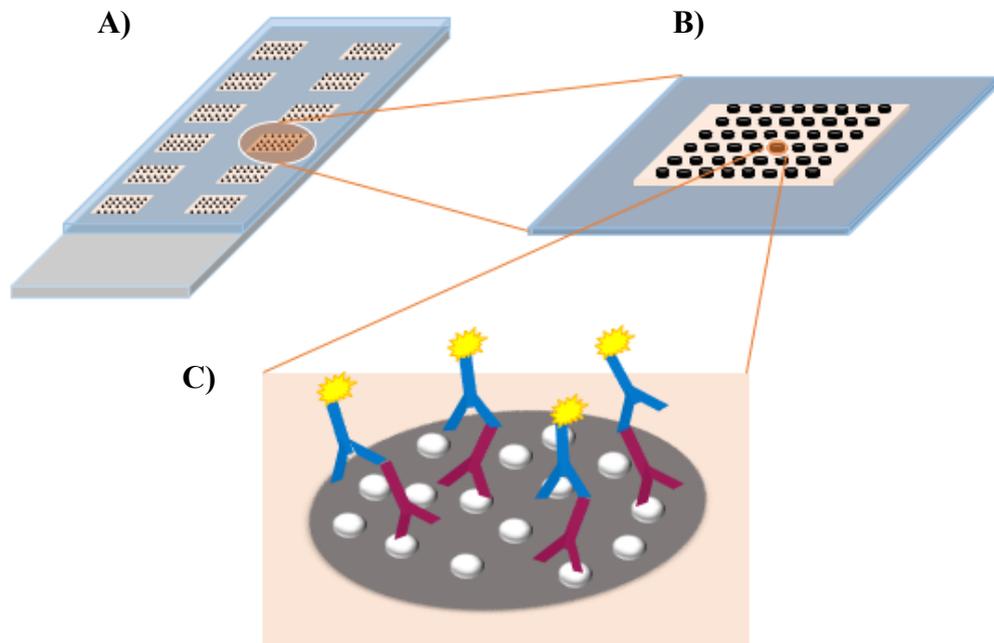


Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Allergen-Microarrays (HARWANEGG et al., 2003): A) Auf einem Trägermaterial (z. B. Glasobjektträger) sind separate Testfelder aufgebracht. B) Jedes Testfeld kann mit mehreren Hundert verschiedenen Allergenen bestückt werden, die in sogenannten Spots (schwarz) auf das Testfeld aufgetragen sind. C) Die allergenspezifischen Antikörper (lila) binden an die passenden Allergene und können mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Anti-Antikörpern (blau) detektiert werden

3.2. Anwendung in der Allergiediagnostik

Durch die Erforschung von Allergenen auf molekularer Ebene wurden die bedeutendsten IgE-bindenden Proteinstrukturen (Epitope) identifiziert und können heutzutage sogar rekombinant hergestellt werden (HARWANEGG & HILLER, 2005). Die Verwendung rekombinant hergestellter Epitope in der Allergiediagnostik birgt deutliche Vorteile gegenüber den bisher verwendeten Allergenextrakten. Da der Allergengehalt bei Extrakten stark variieren kann, ist eine Standardisierung des Tests häufig schwierig und kann durch die Verwendung rekombinant hergestellter Moleküle deutlich verbessert werden (JAHN-SCHMID et al., 2003). Bei Extrakt-basierten Testmethoden kann lediglich die Allergiequelle

bestimmt werden, jedoch nicht die krankheitsauslösenden Epitope (HILLER et al., 2002; JAHN-SCHMID et al., 2003). Eine Unterscheidung von Patienten, welche tatsächlich gegen mehrere unverwandte Allergenquellen sensibilisiert sind, und Erkrankten, die eine Kreuzsensibilität auf ein bestimmtes Allergen entwickelt haben und deshalb bei Allergenen unterschiedlicher Quellen Kreuzreaktionen zeigen, ist dabei nicht möglich. Durch den Einsatz rekombinant hergestellter Allergenmoleküle kann auch die Therapie für den Patienten verbessert werden, was folgendes Beispiel verdeutlicht: Bet v 1 konnte als Hauptallergen der Birke (*Betula verucosa*) identifiziert werden und etwa 95 % aller Birken-Allergiker bilden Bet v 1-spezifische IgE-Antikörper aus. Viele andere Allergenquellen, wie z. B. Karotte, Sellerie, Hasel oder Erle, enthalten Bet v 1-ähnliche Epitope. Die Sensibilisierung gegenüber Birke kann also zu einer Kreuzsensibilisierung gegenüber diesen Allergenen führen. Die Immunotherapie mit Bet v 1-standardisiertem Birkenpollenextrakt wird bei einem Patienten mit spezifischen IgE-Antikörpern gegenüber Bet v 1 also nicht nur zu einer Verbesserung der Birkenpollenallergie, sondern auch zu einer Verbesserung der Kreuzreaktionen führen. Einem Patienten, der im Extrakt-basierten Allergietest zwar gegenüber Birkenpollen reagiert, jedoch keine Bet v 1-spezifischen IgE-Antikörper produziert, ist eine Immunotherapie mit Birkenpollenextrakt nicht zu empfehlen. Hier besteht sogar die Gefahr einer Sensibilisierung durch die Immunotherapie (HARWANEGG et al., 2003). Mithilfe rekombinanter Allergene können also spezifische IgE-Antikörper gegen die allergieauslösenden Moleküle detektiert werden. Damit lassen sich genaue Sensibilisierungsprofile für jeden Patienten erstellen und es kann eine optimierte Immunotherapie entwickelt werden (OTT et al., 2006). Dieser diagnostische Ansatz wird „component resolved diagnosis“ (CDR) genannt.

Bei der Verwendung einzelner Allergenepitope in der Diagnostik stoßen die bisher verwendeten Testmethoden jedoch schnell an ihre Grenzen. Für eine umfassende Diagnose müssen bei jeder Allergenquelle mehrere Epitope getestet werden. Die Anzahl der zu testenden Komponenten übersteigt die Kapazität der bisherigen Allergietests (HARWANEGG & HILLER, 2005). Durch die Entwicklung des Proteinmicroarrays konnte dieses Problem jedoch gelöst werden. Wie in Abschnitt 3.1 bereits beschrieben, können in einem Testfeld mehrere Hundert verschiedene Proteine gespottet werden. Der Proteinmicroarray erlaubt so die parallele Analyse

einer großen Anzahl an Allergenen in einem Testschritt (DEINHOFER et al., 2004; SHREFFLER, 2011).

Zudem wird für den Microarray nur eine sehr geringe Menge an Serum zur Durchführung der Analyse benötigt. Während für die traditionellen *in vitro* Testmethoden zwischen 10 und 100 µl (Mikroliter) Serum pro getestetem Allergen erforderlich ist, werden für den gesamten Proteinmicroarray lediglich 20-40 µl Serum benötigt (HILLER et al., 2002; DEINHOFER et al., 2004; SHREFFLER, 2011). Die geringe Menge an benötigtem Probenmaterial macht die Microarraytechnologie, unter anderem in der Pädiatrie, zu einem wertvollen diagnostischen Mittel (OTT et al., 2006).

Es wird jedoch nicht nur weniger Probenmaterial benötigt, auch die Menge an verwendetem Allergen ist deutlich geringer. Während die bisherigen Testverfahren mit einem Allergenüberschuss arbeiten, ist die Allergenmenge beim Microarray 10 Millionen mal niedriger (LUPINEK et al., 2014). Zu Beginn wurde dies als Nachteil des Systems gewertet, mittlerweile hat es sich aber als Vorzug herausgestellt (DEINHOFER et al., 2004). Durch die limitierte Anzahl an verfügbaren Epitopen konkurrieren die allergenspezifischen IgE-Antikörper mit anderen Antikörperklassen um die Bindung an das Allergen. Dies spiegelt eher die natürliche Situation im Körper wieder, da auch hier andere Ig-Isotypen, durch Bindung an das Allergen oder sterische Hinderung, die IgE-Bindung herabsetzen können (LUPINEK et al., 2014). Durch die Verwendung unterschiedlicher Fluoreszenzmarkierungen und Detektionsantikörper ist es sogar möglich, verschiedene Ig-Klassen im Patientenserum in einem Testschritt zu detektieren (HILLER et al., 2002; HARWANEGG & HILLER, 2005). Die möglicherweise protektive Rolle von Antikörpern, welche mit IgE um die Bindung an das Allergen konkurrieren, kann so untersucht werden (HILLER et al., 2002).

Wie bereits oben beschrieben, kann der Proteinmicroarray bei der Auswahl der Patienten helfen, die von einer Immunotherapie profitieren würden (HARWANEGG et al., 2003; HARWANEGG & HILLER, 2004). Durch die simultane Detektion unterschiedlicher Antikörperklassen kann auch die Hoch- und Runter-Regulierung von IgE und IgG während einer allergenspezifischen Immunotherapie dargestellt und so der Therapieerfolg überprüft werden. Aber auch mögliche Nebenwirkungen einer Immunotherapie, wie beispielsweise eine neu

auftretende Sensibilisierung, können mithilfe des Proteinmicroarrays schnell und minimalinvasiv festgestellt werden (HARWANEGG & HILLER, 2005).

3.3. Schwierigkeiten des Allergen-Microarrays

Neben den vielen Vorteilen birgt der Proteinmicroarray auf Grund der komplexen und noch jungen Technologie auch Schwierigkeiten. Ein besonders kritischer Aspekt im Herstellungsprozess des Allergen-Microarrays ist die Immobilisation der Proteine auf der Trägeroberfläche. Die Qualität der Testergebnisse wird davon maßgeblich beeinflusst (HARWANEGG & HILLER, 2004; GUPTA et al., 2016). Die verschiedenen Proteine sind physikalisch und strukturell gesehen sehr heterogene Moleküle und es ist deshalb nicht möglich, eine einheitliche, adhäsive Beschichtung zur Immobilisation auf dem Trägermaterial zu konzipieren (ANGENENDT et al., 2002; HARWANEGG & HILLER, 2004). Zudem neigen Proteine bei Immobilisation sehr schnell zur Denaturierung und somit zum Funktionsverlust, weswegen ein nicht-denaturierendes Umfeld geschaffen werden muss. Da der Microarray zum Hoch-Durchsatz-Screening entwickelt wurde, muss die Auflage zudem schnell und preisgünstig in gleichbleibender Qualität hergestellt werden können und einfach in der Handhabung sein. Damit eine Verfälschung der Ergebnisse ausgeschlossen werden kann, darf die Oberflächenbeschichtung außerdem keine oder nur geringe Autofloreszenz aufweisen (ANGENENDT et al., 2002). Neben der Beschichtung muss auch die Qualität der verwendeten Proteine streng kontrolliert werden. Wie oben bereits erwähnt, sollten für die Herstellung des Allergen-Microarrays bevorzugt rekombinant hergestellte oder hoch aufgereinigte, natürliche Komponenten verwendet werden. Man weiß jedoch, dass rekombinante Allergene stark von ihren natürlich vorkommenden Pendanten abweichen können, da durch die fehlende post-translationale Modifikation der Proteine die Komplexität der Epitope reduziert sein kann. Eine Kombination aus rekombinant hergestellten Proteinen und ausgewählten Allergenextrakten könnte dieses Problem lösen (HARWANEGG & HILLER, 2004).

Die hohe Empfindlichkeit des Testsystems macht zudem die Handhabung des Microarrays nicht ganz einfach. So können beispielsweise Brüche des Glasobjektträgers zur Bildung von Fluoreszenzartefakten beim Auslesen führen. Auch Staubpartikel auf der Oberfläche oder Austrocknung der Beschichtung können zu einem artifiziellen Anstieg des Signals führen. Bei der Auswertung sind solche Artefakte vom Untersucher kaum zu identifizieren und können so zu

falschen Ergebnissen führen (DEINHOFER et al., 2004). Die Auswertung des durch den Laserscanner erstellten Bildes erfolgt in der Regel mittels einer Software-basierten Bildanalyse. Die Software bewertet die Intensität der Fluoreszenz, doch auch hier können Fehlerquellen liegen. Das Programm arbeitet mit einem vordefinierten Raster für die abzulesenden Spots. Durch die Spotting-Technik kann es aber zu Abweichungen der Spot-Positionen bei den einzelnen Testfeldern kommen. Wenn ein Spot von der vorgegebenen Position abweicht und nicht exakt im Raster liegt, wird die Fluoreszenz durch die Software nicht korrekt abgelesen. Auch die bereits erwähnten Artefakte können von der Software nicht bewertet werden und führen zu falschen Ergebnissen. Aus diesem Grund muss jede Auswertung von einem erfahrenen Untersucher visuell auf Softwarefehler kontrolliert werden (HARWANEGG & HILLER, 2004; GUPTA et al., 2016).

3.4. Sensitivität und Spezifität

Um die Sensitivität und Spezifität des Allergen-Microarrays zu beurteilen, haben Jahn-Schmid et al. (2003) den Proteinmicroarray mit traditionellen in vitro IgE-Testverfahren verglichen. Hierzu wurde IgE gegen Gras- und Baumpollen aus dem Serum atopischer Patienten mittels eines ELISAs und eines CAP/RAST (Carrier-Polymer-System/Radio-Allergo-Sorbent-Test) -Systems bestimmt. Zusätzlich wurde ein Microarray durchgeführt und die Ergebnisse verglichen. Der Microarray weist in dieser Studie die gleiche Sensitivität wie der ELISA auf, das CAP/RAST-System ist im Vergleich weniger sensitiv. Die Spezifität des Microarrays ist vergleichbar mit den beiden herkömmlichen Testverfahren. Um auch die Reproduzierbarkeit des Allergen-Microarrays zu evaluieren, wurde eine Serientestung durchgeführt und die allergenspezifischen IgE-Antikörper von sechs Patienten jeweils auf 20 Microarray-Feldern bestimmt. Der Variationskoeffizient lag, je nach Allergen, zwischen 25–47 %. Diese Varianz ist vermutlich größtenteils durch Schwierigkeiten in der Herstellung des Microarrays, wie sie in Abschnitt 3.3 beschrieben werden, bedingt (JAHN-SCHMID et al., 2003). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch andere Studien (KIM et al., 2002; DEINHOFER et al., 2004). Sensitivität und Spezifität scheinen vergleichbar mit den bisherigen Testmethoden zu sein.

3.5. Allergen-Microarray in der Tiermedizin

Bisher wird der Proteinmicroarray lediglich in der Humanmedizin zur Allergiediagnostik verwendet und kommerziell angeboten. Dort stellt diese Testmethode derzeit die umfassendste und genaueste Methode zur allergenspezifischen IgE-Messung dar. Mit keiner anderen Testmethode kann auf so viele unterschiedliche Allergene getestet werden und der Ansatz der „component resolved diagnosis“ so umfassend umgesetzt werden (MARI et al., 2011). Auch in der Tiermedizin könnte der Allergen-Microarray ein sehr nützliches Instrument zur allergenspezifischen IgE-Bestimmung und Allergiediagnostik sein. Marti et al. (2015) haben versucht das System des Proteinmicroarrays für die Diagnose der Insektenstich-Hypersensitivität (insect bite hypersensitivity = IBH) beim Pferd zu übertragen. Dazu wurde Serum von 133 Pferden genommen. Davon waren 63 Pferde gesunde Kontrolltiere, 35 Pferde mit klinisch diagnostizierter Insektenstichhypersensitivität, sechs Tiere mit rezidivierender Atemwegsobstruktion und 29 Tiere mit wiederkehrender Urtikaria. Bei allen Tieren wurde ein Proteinmicroarray mit 360 verschiedenen Extrakten und reinen Proteinen durchgeführt, darunter auch verschiedene rekombinant hergestellte Cullicoides-Allergene und -Extrakte. Die Daten wurden mit einer komplexen mathematischen Analysesoftware ausgewertet und die IBH-erkrankten Tiere konnten von der gesunden Kontrollgruppe sehr sicher unterschieden werden. Damit wurde gezeigt, dass sich der Allergen-Microarray zur Allergiediagnose bei Pferden eignet (MARTI et al., 2015). Wie bereits erwähnt, wird der Allergen-Microarray noch nicht kommerziell in der Tiermedizin angeboten und verwendet. Nach Wissen der Autorin existieren bisher keine Studien zur Anwendung eines Allergen-Microarrays beim Hund.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Studiendesign

Die Studie wurde als Fall-Kohorten Studie durchgeführt.

2. Patienten

Es wurden insgesamt 48 Hunde in die Studie eingeschlossen. Alle Hunde stammen aus Privatbesitz und aus dem Patientenstamm der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München.

2.1. Einschlusskriterien

Um in die Studie eingeschlossen werden zu können, musste bei den Hunden eine atopische Dermatitis vorliegen. Zur Diagnose der AD wurde bei jedem der Patienten eine ausführliche Anamnese und klinische Untersuchung durchgeführt. Zum Ausschluss einer Flohspeichelallergie als Ursache, wurde den Patienten eine regelmäßige Flohprophylaxe verschrieben und bei Verdacht auf andere Ektoparasiten ein Hautgeschabsel durchgeführt und/oder geeignete Ektoparasitika angewendet. Hautinfektionen verursacht durch Hefepilze oder Bakterien wurden mittels Abklatschzytologie als Ursache der Juckreizsymptome ausgeschlossen. Um die Beteiligung einer möglichen Futtermittelallergie zu evaluieren, führten die Besitzer bei den Hunden eine sechs- bis achtwöchige Eliminationsdiät mit anschließender Futterprovokation durch.

Um die Ergebnisse des Intradermaltests und Allergen-Microarrays nicht zu beeinflussen, durften die Hunde mindestens vier Wochen vor Durchführung des Intradermaltests und der Blutabnahme für den Microarray keine oralen oder injizierbaren Glukokortikoide sowie Ciclosporin erhalten. Orale Antihistaminika und topische Glukokortikoide mussten die Besitzer mindestens zwei Wochen vor dem Test absetzen. Auch Apoquel[®] durfte den Hunden zwei Wochen vorher nicht mehr verabreicht werden.

2.2. Ausschlusskriterien

Alle Tiere wurden vor Durchführung des Intradermaltests klinisch untersucht. Wurden gesundheitliche Einschränkungen festgestellt, die gegen eine Sedation sprechen, führte dies zum Ausschluss von der Studie.

Wiesen die Hunde im Testfeld des Intradermaltests (seitliche Thoraxwand) Hautläsionen, wie Rötung, Schwellung, Papeln oder Pusteln auf, konnte der Intradermaltest nicht durchgeführt werden, da dadurch die Beurteilung der Testreaktionen hätten verfälscht werden könnten.

3. Studiendurchführung

Die Studie wurde von der zuständigen Ethikkommission unter der Nummer: 48-18-05-2015 genehmigt. Bei jedem der eingeschlossenen Hunde wurde ein Intradermaltest durchgeführt und zudem eine Serumprobe für die Durchführung eines Allergen-Microarrays entnommen. Vorher wurde bei allen Patienten eine ausführliche klinische und dermatologische Untersuchung durchgeführt. Die Besitzer der Hunde füllten einen detaillierten Fragebogen zur Klinik der Hunde aus (siehe Anhang 3). Die aktuelle Juckreizintensität wurde anhand einer vorgegebenen Skala (Anhang 4) von den Besitzern eingeschätzt und in den Fragebogen eingetragen. Zudem wurde die Ausprägung des Juckreizes über das Jahr gesehen abgefragt und vom Besitzer in eine Tabelle eingetragen. Die Besitzer machten im Fragebogen zudem ausführliche Angaben zur Haltung ihres Hundes, wie beispielsweise Lebensraum oder Bodenbelag im Haus.

3.1. Sedation

Da für die Durchführung des Intradermaltests eine Sedation notwendig ist, wurde den Patienten ein peripherer Venenverweilkatheter gelegt. Dieser wurde entweder in die *Vena (V.) cephalica* oder die *V. saphena lateralis* eingelegt. Die Sedation erfolgte mit dem Medikament Medetomidinhydrochlorid (Sedator[®] 1mg/ml; Eurovet Animal Health B.V., Bladel, Niederlande) in einer Dosierung von 3–5 µg/kg i.v. (intravenös). Nach Abschluss des Tests wurde die Sedation, wenn notwendig, mit Atipamezolhydrochlorid (Atipam[®] 5 mg/ml; Eurovet Animal Health B.V., Bladel, Niederlande) i.m. (intramuskulär) antagonisiert.

3.2. Blutprobenentnahme

Vor Verabreichung der Sedation wurde jedem Patienten über den zuvor eingelegten Venenzugang ca. 10 ml Blut für den Microarray entnommen. Das Blut wurde frühestens 20 Minuten (min) nach Entnahme bei 4000 Umdrehungen/min für fünf Minuten zentrifugiert (Zentrifuge Universal 320 R; Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttingen, Deutschland). Danach wurde das Serum abpipettiert und bis zur

weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.3. Intradermaltest

Wie bereits beschrieben, wurden die Tiere zur Durchführung des Intradermaltests sediert, um eine exakte intradermale Injektion ohne Abwehrbewegungen des Tieres zu gewährleisten. Nach Eintritt des sedativen Effekts wurde an der seitlichen Thoraxwand ein ausreichend großes Testfeld (ca. 20 x 10 cm) rasiert. Auf der rasierten Hautfläche wurden die Injektionsstellen der unterschiedlichen Allergene mit Punkten markiert, um diese bei der Beurteilung später besser nachvollziehen zu können. Es wurde jeweils über und unter jedem Punkt ein Allergen injiziert (Abbildung 2). Insgesamt wurden 42 Testallergene (siehe Tabelle 5) intradermal injiziert. Verwendet wurden die Allergenextrakte des Artuветrin® Skin Tests der Firma Artu Biologicals Europe B.V. (Lelystad, Niederlande). Die Konzentrationen der Testlösungen können der Tabelle 4 entnommen werden.

Tabelle 4: Konzentration der im Intradermaltest verwendeten Artuветrin® Testlösungen

<i>Allergengruppe</i>	<i>Konzentration in Noon Units (NU)/ml bzw. µg/ml</i>
Pollen	1000 NU/ml
Milben	100 NU/ml
Epithel	100 µg/ml
Schafwolle	10 µg/ml
Pilze	100 µg/ml
Insekten	100 NU/ml
Mosquito	1000 NU/ml
Stubenfliege	10 NU/ml



Abbildung 2: Intradermaltest beim Hund. An der seitlichen Brustwand wird ein ca. 20x10 cm großes Testfeld rasiert. Über und unter jedem Punkt wird ein Allergen injiziert. An erster und letzter Position werden jeweils die Negativ- und Positivkontrolle injiziert. Die Reaktionen der Allergene werden anhand ihres Durchmessers, Rötung und Konsistenz mit Werten von 0 (entspricht der Negativkontrolle) bis 4 (entspricht der Positivkontrolle) beurteilt.

Das Artuvetrin® Skin Test-Set enthält außerdem eine Negativkontrolle (Verdünnungsmittel der Allergenlösungen = phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit 0,47 %igem Phenol) und Positivkontrolle (Histamin). Diese wurden jeweils vor dem ersten und nach dem letzten Allergen intradermal injiziert. Die Injektion erfolgte mittels einer Insulinspritze (Omnican® 20; B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland). Injiziert wurde jeweils ein Volumen von etwa 0,1 ml. Nach 15 Minuten wurde der Test das erste Mal und nach 25 Minuten ein zweites Mal abgelesen. Die Beurteilung der Testreaktionen erfolgte nach einem subjektiven Verfahren (siehe Abschnitt II.2.2) durch einen erfahrenen Dermatologen (HUBBARD & WHITE, 2011). Nach dem Ablesen wurde die Sedation, wenn notwendig, antagonisiert.

Tabelle 5: Im Intradermaltest verwendete Allergenextrakte

<i>Gruppe</i>	<i>Allergenextrakt</i>
Epithelien	Epithelmix II (Ente, Gans, Huhn) Schafwolle
Milben	Acarus siro (Getreidemilbe) Dermatophagoides farinae (Hausstaubmilbe) Dermatophagoides pteronyssinus (Hausstaubmilbe) Lepidoglyphus destructor (Heumilbe) Tyrophagus putrescentiae (Modermilbe)
Insekten	Aedes communis (Mosquito) Culex (Stechmücke) Culicoides spp. (Gnitzen) Musca domestica (Stubenfliege) Periplanata Americana (Kakerlake)
Pollen von Feldfrüchten	Brassica napus (Raps)
Kräuterpollen	Ambrosia elatior (Ambrosie) Artemisia vulgaris (Beifuß) Chenopodium album (weißer Gänsefuß) Kräuterpollenmix (Beifuß, Brennnessel, Löwenzahn, Spitzwegerich) Parietaria officinalis (Glaskraut) Plantago lanceolata (Spitzwegerich) Rumex acetosella (kleiner Sauerampfer) Solidago virgaurea (echte Goldrute)
Baumpollen	Baumpollenmix I (Birke, Erle, Hasel) Baumpollenmix II (Stieleiche, Buche, Ulme) Corylus avellana (Hasel) Fagus sylvatica (Buche) Populus alba (Silberpappel)
Gräserpollen	Agropyron repens (gemeine Quecke) Agrostis gigantea (weißes Straußgras) Alopecurus pratensis (Wiesenfuchsschwanz) Cynodon dactylon (Hundszahngras) Dactylis glomerata (Knäuelgras) Holcus lanatus (wolliges Honiggras)

	Lolium perenne (Weidelgras)
	Poa pratensis (Wiesenrispengras)
Schimmelpilze	Alternaria alternata
	Aspergillus fumigatus
	Cladosporium herbarum

3.4. Microarray

Die von den atopischen Hunden gewonnenen Serumproben wurden nach England an die School of Biosciences der Universität Nottingham gebracht. Dort wurde ein Allergen-Microarray durchgeführt.

Für den Allergen-Microarray wurden 185 verschiedene gereinigte Proteine und Extrakte (siehe Anhang 5) auf einem FAST[®] Objektträger (Whatman Schleicher & Schuell, Dassal, Deutschland) mit 16 Testfeldern gespottet (Abbildung 3). Die Oberfläche der Objektträger ist mit einem Nitrocellulose-Polymer beschichtet, welches die Proteine nicht-kovalent und irreversibel bindet.

Bevor der Array mit dem Serum inkubiert werden kann, muss der Objektträger mit dreiprozentigem bovines Serumalbumin (BSA) in phosphatgepufferter Salzlösung (Phosphate buffered saline = PBS) gesättigt werden. Dadurch werden unspezifische Bindungen und Interaktionen der Antikörper verhindert und das Signal-Stör-Verhältnis verbessert. Dazu wurde der Objektträger in einen Corning[®] 5 Objektträgerbehälter (Produkt # 40082; Corning Incorporated, Corning, New York, USA) eingesetzt und der Behälter mit ca. 25 ml dreiprozentigem BSA ohne Luftblasenbildung aufgefüllt. Der Behälter wurde mit Parafilm[®] (Pechiney Plastic Packaging, Chicago, Illinois, USA) versiegelt und mit Alufolie vor Lichteinstrahlung geschützt. Danach wurde der Behälter für drei Stunden bei 37°C unter Rotation in einem Mini-Hybridisierungs-ofen inkubiert. Im Anschluss wurden die Objektträger drei Mal für jeweils zwei Minuten mit PBS plus Tween[®] 20 (Croda International Plc., Snaith, Vereinigtes Königreich) und fünf Mal für jeweils eine Minute mit MilliQ-Wasser (= „ultrareines“ Wasser mit einer MilliQ[®]-Filteranlage hergestellt; Merck Millipore KGaA, Billerica, Massachusetts, USA) gewaschen. Zuletzt wurde der Objektträger zur Trocknung bei 1000 Umdrehungen/min (MSE Mistral 3000i; MSE, London, Vereinigtes Königreich) für zehn Minuten zentrifugiert. Nach dem Trocknen wurde ein ProPlate[®] Objektträgermodul (Grace Bio-Labs, Bend, Oregon, USA) aufgesetzt (Abbildung 4), welches die Testfelder

gegeneinander abdichtet und Kammern bildet, in welche die Testlösungen pipettiert werden. Jedes Testfeld wurde zuerst mit 150 µl von 0,2%igem PBST (= PBS + Tween[®] 20) pro Vertiefung befeuchtet. Danach wurden die Serumproben der Patienten mit 2%igem BSA in 0,2%igem PBST auf 30 Prozent verdünnt. Nach Entfernung des PBST aus den Vertiefungen wurden von jedem Patienten jeweils 100 µl verdünntes Serum in ein Testfeld pipettiert. Ein Testfeld wurde als Negativkontrolle lediglich mit der Verdünnungslösung ohne Serum bestückt. Im Anschluss wurde das ProPlate[®] Objektträgermodul mit dem ProPlate[®] Slide Module Seal Strip (Grace Bio-Labs, Bend, USA) versiegelt und für zwei Stunden bei 37°C im ThermoHybaid HyPro20 (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) mit dem Programm AVS 3 (automatic vibration system program 3) inkubiert. Im nächsten Schritt wurde die Platte mit dem Modul dreimalig auf dem BioTek ELx50 Plate Washer (BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA) mit PBST (0,05 %) gewaschen. Als sekundäre Antikörper wurden Biotin-markierte Maus Anti-Hund IgEs (LS-C57551, Biotin; LSBio LifeSpan Biosciences, Inc., Seattle, Washington, USA) verwendet und 1:200 mit BSA (1 %) in PBST (0,2 %) verdünnt. In jede Vertiefung wurden 100 µl der verdünnten sekundären Antikörper pipettiert und im ThermoHybaid (AVS3) bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Danach folgten drei Waschschrte mit PBST (0,05 %) im BioTek Plate Washer. Als Marker wurde der an Streptavidin gekoppelte Fluoreszenzfarbstoff Streptavidin Cy5[®] (PA45001; GE Healthcare, Little Chalfont, Vereintes Königreich) verwendet. Das Streptavidin bindet an das am sekundären Antikörper gebundene Biotin und markiert damit die Antikörper. Streptavidin Cy5[®] wurde zunächst 1:1000 mit BSA (1 %) in PBST (0,2 %) verdünnt und danach jeweils 100 µl der Lösung in jedes Testfeld pipettiert. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 37°C im ThermoHybaid (AVS 3) folgten drei letzte Waschschrte mit PBST (0,05 %) im BioTek Plate Washer. Nach dem Abnehmen des ProPlate[®] Objektträgermoduls wurde die Microarray-Platte in ein Objektträgermagazin gelegt und zur Trocknung bei 1000 Umdrehungen/min für 10 Minuten zentrifugiert (MSE Mistral 3000i; MSE, London, Vereintes Königreich). Zum Auslesen der Fluoreszenz wurde die Microarray-Platte mit einem Microarray-Scanner (GenePix 4000B; Molecular Devices, Sunnyvale, Kalifornien, USA) gescannt. Als Einstellungen für die PMT (=photomultiplier tube, Photoelektronenvervielfacher; Elektronenröhre zur Verstärkung schwacher

Lichtsignale) wurden 440 (645 Nanometer = nm) und 310 (310 nm) gewählt. Die Auswertung und Prozessierung der abgelesenen Fluoreszenz erfolgte mit Hilfe der GenePix Pro Software v6.0.1.27 (Molecular Devices, Sunnyvale, Kalifornien, USA). Abbildung 5 zeigt einen Ausschnitt des dadurch entstehenden Bildes.



Abbildung 3: Microarray-Platte mit 16 Testfeldern



Abbildung 4: Microarray-Platte mit aufgesetztem ProPlate® Objektträgermodul: In die Vertiefungen werden die Serumproben und Reaktionslösungen einpipettiert

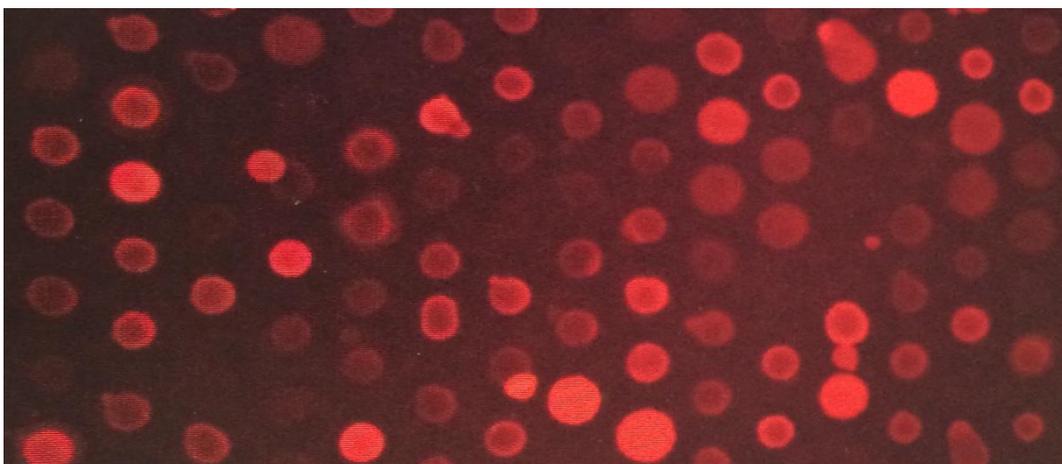


Abbildung 5: Ausschnitt des durch den Fluoreszenzscanner erstellten Bildes der Allergen-Microarray-Testplatte

4. Statistik

Die gesammelten Daten wurden zur besseren statistischen Auswertung wie folgt aufgearbeitet: Im Fragebogen haben die Besitzer die Juckreizintensität ihres Hundes für jeden Monat eingeschätzt und mit den Kategorien kein Juckreiz (0), leichter Juckreiz (1), mittelschwerer Juckreiz (2) und schwerer Juckreiz (3) bewertet. Zur Gruppierung der Klinik wurde in den Zeitspannen Frühjahr (Februar, März, April), Sommer (Mai, Juni, Juli, August), Herbst (September, Oktober, November) und Winter (Dezember, Januar) jeweils der maximale Monatswert einer Saison bestimmt und den Hunden so eine jahreszeitabhängige Juckreizintensität zugewiesen.

Zur Auswertung wurden die im Microarray und Intradermaltest verwendeten Allergene in folgende sechs Gruppen eingeteilt: Milben, Schimmelpilze, Epithelien, Kräuterpollen, Baumpollen und Gräserpollen. Zudem wurde zwischen ganzjährigen und saisonalen Allergenen unterschieden. Tabelle 6 zeigt die Einteilung der in die Statistik einbezogenen Allergene des Intradermaltests. In jeder Gruppe wurde die maximale Testreaktion des Patienten bestimmt und dieser Wert als Gesamtwert für die Allergengruppe verwendet.

Die im Intradermaltest verwendeten Allergene der Gruppe Insekten (Mosquito, Stechmücke, Gnitzen, Stubenfliege, Kakerlake) wurde in die statistische Auswertung nicht mit einbezogen, da sie nicht als Aeroallergen fungieren, bzw. die Kakerlake in den meisten deutschen Haushalten nicht vorhanden sind.

Um eine Beziehung der Reaktionen von Intradermaltest und Microarray zu überprüfen, wurden die Testergebnisse der Allergene, die in beiden Testmethoden getestet wurden, verglichen. Dazu wurde die Korrelation nach Kendall und Spearman überprüft. Bei einem Wert von 1 beziehungsweise -1 liegt eine maximale Korrelation vor, 0 bedeutet keine Korrelation der verglichenen Werte. Als relevante Korrelation wurde ein Wert $> 0,8$ beziehungsweise $< -0,8$ angesehen.

Zur Evaluierung der Ergebnisse des Intradermaltests wurde die Übereinstimmung der Testreaktionen mit der Klinik der Studienteilnehmer untersucht. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurde der Fisher's Exact Test verwendet. Ein *P*-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

Die statistische Untersuchung der Daten erfolgte mithilfe der statistischen

Programmiersprache R und der dafür entwickelten Software RStudio Version 3.3.1 (RStudio, Inc.; Boston, Massachusetts, USA), sowie der Software GraphPad Prism® 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA).

Tabelle 6: Die in die Statistik einbezogenen Intradermaltest-Allergene und deren Gruppeneinteilung

Ganzjährige Allergene	Milben	<i>Dermatophagoides farinae</i> , <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> , <i>Tyrophagus putrescentiae</i> , <i>Lepidoglyphus destructor</i> , <i>Acarus siro</i>
	Epithelien	Schaf, Ente, Gans, Huhn
	Schimmelpilze	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Saisonale Allergene	Buche, Hasel, Pappel, Raps, Birke, Erle, Stieleiche, Ulme, Quecke, Weidelgras, weißer Gänsefuß, Beifuß, Goldrute, Knäuelgras, weißes Straußgras, Wiesenrispengras, Wiesenfuchsschwanz, Hundszahngras, Ambrosie, Sauerampfer, Honiggras, Spitzwegerich, Glaskraut, Raps, Brennnessel, Löwenzahn, <i>Alternaria alternata</i> , <i>Cladosporium herbarum</i>	

IV. ERGEBNISSE

1. Patienten

Insgesamt wurden 48 Hunde in die Studie eingeschlossen, bei denen ein Intradermaltest durchgeführt und Blut für den Microarray abgenommen wurde. Alle Besitzer füllten den Fragebogen zur Anamnese und Klinik ihres Hundes aus.

1.1. Geschlechtsverteilung

An der Studie nahmen 20 weibliche Tiere (41,7 %) und 28 männliche Tiere (58,3 %) teil. Zwölf Hündinnen waren kastriert, acht waren intakt. Von den männlichen Tieren waren zwölf intakt und 16 kastriert.

1.2. Alter

Das Alter der teilnehmenden Hunde lag zwischen einem Jahr und elf Jahren. Das durchschnittliche Alter lag bei 4,6 Jahren, das mediane Alter bei 3,75 Jahren.

1.3. Rasseverteilung

An der Studie nahmen Hunde unterschiedlicher Rassen teil. Die Verteilung ist Tabelle 7 zu entnehmen

1.4. Gesundheitsstatus

85,4 % der Hunde in der Studie waren, abgesehen von der Allergie, gesund. Sieben der insgesamt 48 Patienten, also 14,6 %, litten neben der Allergie noch an einer anderen Erkrankung. Folgende Erkrankungen wurden von den Besitzern angegeben: Hypothyreose, solitärer Mastzelltumor, Epilepsie, Augenleiden, IBD (inflammatory bowel disease), Wirbelveränderungen und Herzerkrankung.

1.5. Futtermittelallergie

Bei 33,3 % der Studienteilnehmer wurde durch eine Eliminationsdiät eine Futtermittelallergie diagnostiziert, die für einen Teil der Symptome oder für die gesamten Veränderungen verantwortlich war. Bei über der Hälfte (64,6 %) der Patienten waren die allergischen Symptome ausschließlich durch eine Umweltallergie bedingt. Bei einem Hund (2,1 %) konnte eine Futtermittelallergie nicht abschließend ausgeschlossen werden.

Tabelle 7: Anzahl der teilnehmenden Hunderassen

<i>Rasse</i>	<i>Anzahl der Tiere</i>
Mischling	11
Labrador Retriever	6
Französische Bulldogge	5
Boxer	4
Golden Retriever	2
Jack Russel Terrier	2
Mops	2
Altdeutscher Hütehund	1
Australian Shepherd	1
Berner Sennenhund	1
Dobermann	1
Englische Bulldogge	1
English Setter	1
Eurasier	1
Goldendoodle	1
Havanaser	1
Parson Russel Terrier	1
Rhodesian Ridgeback	1
Shiba Inu	1
Toy-Pudel	1
Welsh Terrier	1
West Highland White Terrier	1
Yorkshire Terrier	1

2. Allergen-Microarray

2.1. Allergenabhängige Reaktionen

In Tabelle 8 sind die prozentualen Anteile der Reaktionen > 0 FAU (= fluorescence arbitrary units) einiger ausgewählter Allergene im Allergen-Microarray aufgelistet.

Tabelle 8: Prozentualer Anteil der Reaktionen > 0 FAU (= fluorescence arbitrary units) ausgewählter Allergene im Allergen-Microarray

<i>Allergen</i>	<i>Anteil der Reaktionen > 0 FAU in %</i>
Epithelien	
Schafwolle	37,5
Schimmelpilze	
<i>Aspergillus</i>	87,5
<i>Alternaria</i>	95,8
<i>Cladosporium</i>	93,8
Milben	
<i>Acarus siro</i>	93,8
<i>Tyrophagus putrescentiae</i>	25,0
<i>Lepidoglyphus destructor</i>	33,3
<i>Dermatophagoides farinae</i>	47,9
<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	31,3
Baumpollen	
Silberpappel	56,3
Amerikanische Buche	58,3
gemeine Hasel	25,0
Gräserpollen	
Knäuelgras	64,6
Weidelgras	39,6
Wiesenrispengras	100
Hundszahngras	52,1
wolliges Honiggras	68,8
weißes Straußgras	35,4
Kräuterpollen	
Ambrosie	41,7
Spitzwegerich	70,8
Glaskraut	93,8
Beifuß	60,4
weißer Gänsefuß	83,3
kleiner Sauerampfer	64,6

2.2. Beziehung von Microarray- und Intradermaltest-Reaktionen

Um eine Beziehung der Reaktionen im Intradermaltest und Allergen-Microarray zu evaluieren, wurden die Ergebnisse aller Allergene verglichen, die sowohl im IDT als auch im Microarray verwendet wurden ($n = 24$; Buche, Hasel, Pappel, *D. farinae*, *D. pteronyssinus*, *Tyrophagus putrescentiae*, *Lepidoglyphus destructor*, *Acarus siro*, Ambrosie, Spitzwegerich, Beifuß, Wiesenrispengras, Hundszahngras, Glaskraut, Weidelgras, weißer Gänsefuß, Knäuelgras, weißes Straußgras, Sauerampfer, wolliges Honiggras, Schafepithel, *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium herbarum*, *Alternaria alternata*). In Abbildung 6 sind beispielhaft die Testreaktionen der Allergene Spitzwegerich, *Dermatophagoides farinae*, *Aspergillus fumigatus* und Buche dargestellt. Jeder Punkt steht für die Reaktion eines Patienten im Intradermaltest und Allergen-Microarray. Es konnte keine Korrelation zwischen den Testreaktionen von Allergen-Microarray und Intradermaltest festgestellt werden. So zeigen Patienten, die im Intradermaltest nicht auf das Allergen reagiert haben, teilweise sehr hohe Werte im Microarray und Tiere mit hohen Intradermaltest-Reaktionen häufig keine oder geringe Reaktionen im Protein-Microarray. Auch die Korrelationsberechnungen nach Kendall bzw. Spearman ergaben keine Korrelation zwischen den Testergebnissen. In Tabelle 9 sind die berechneten Korrelationskoeffizienten beispielhaft für *D. farinae*, Spitzwegerich, *Aspergillus* und Buche aufgeführt.

Auch bei der Betrachtung von Allergengruppen ergibt sich ein ähnliches Bild und es ist keine Beziehung zwischen den Testergebnissen von Intradermaltest und Allergen-Microarray zu erkennen. In Abbildung 7 sind beispielhaft die Gruppe der Milben und Baumpollen dargestellt. Auch hier lassen die Korrelationskoeffizienten nach Kendall und Spearman keine Korrelation erkennen (siehe Tabelle 9).

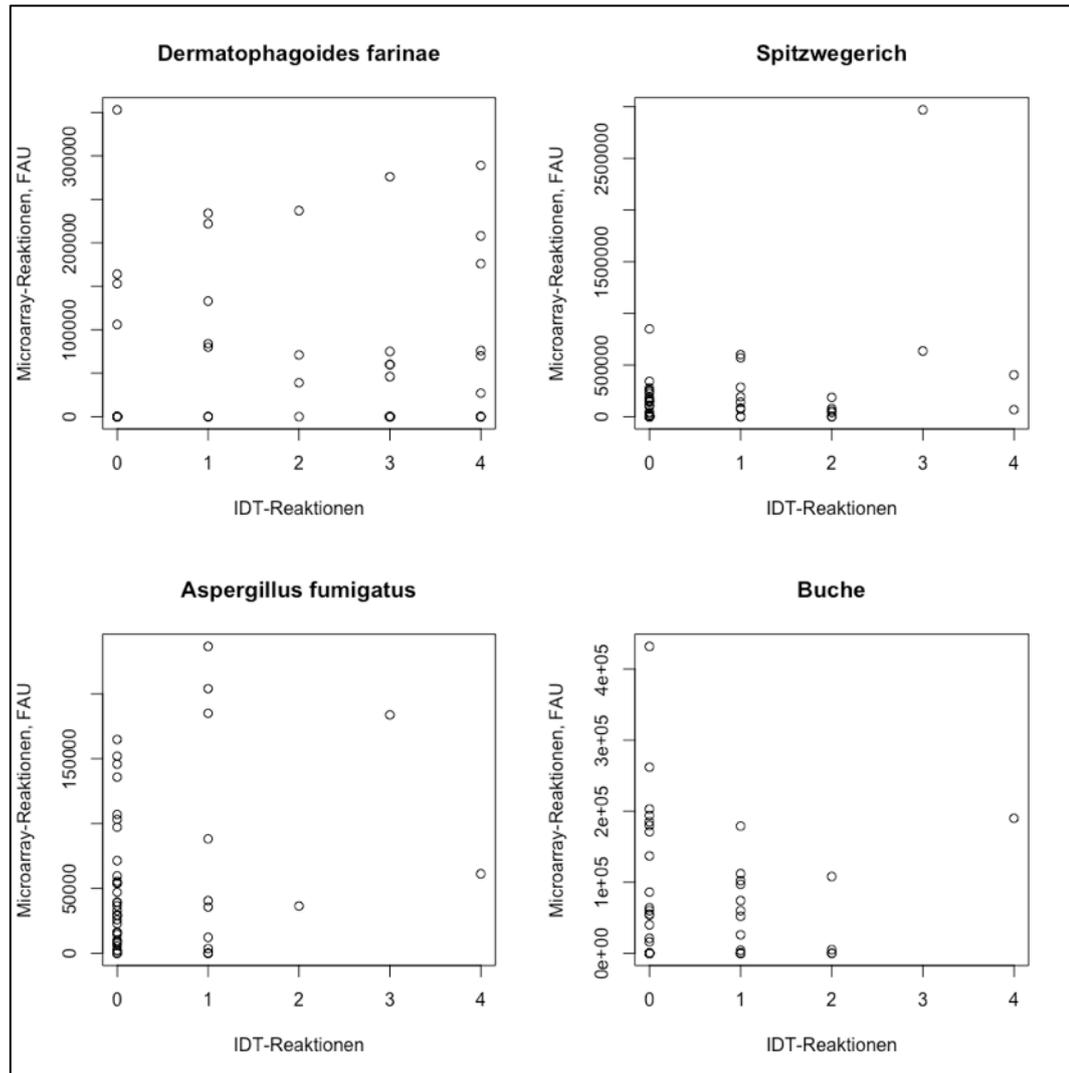


Abbildung 6: Die Abbildung zeigt die Reaktionen der Studienteilnehmer auf die Allergene *Dermatophagoides farinae*, Spitzwegerich, *Aspergillus fumigatus* und Buche im Intradermaltest und Allergen-Microarray. Jeder Punkt steht für die Reaktion eines Patienten. Die x-Achse zeigt die Reaktion des Patienten im Intradermaltest an (0 entspricht einer Reaktion vergleichbar der negativ Kontrolle, 4 vergleichbar der positiv Kontrolle), die y-Achse die Reaktion im Allergen-Microarray. (IDT = Intradermaltest; FAU = fluorescence arbitrary units)

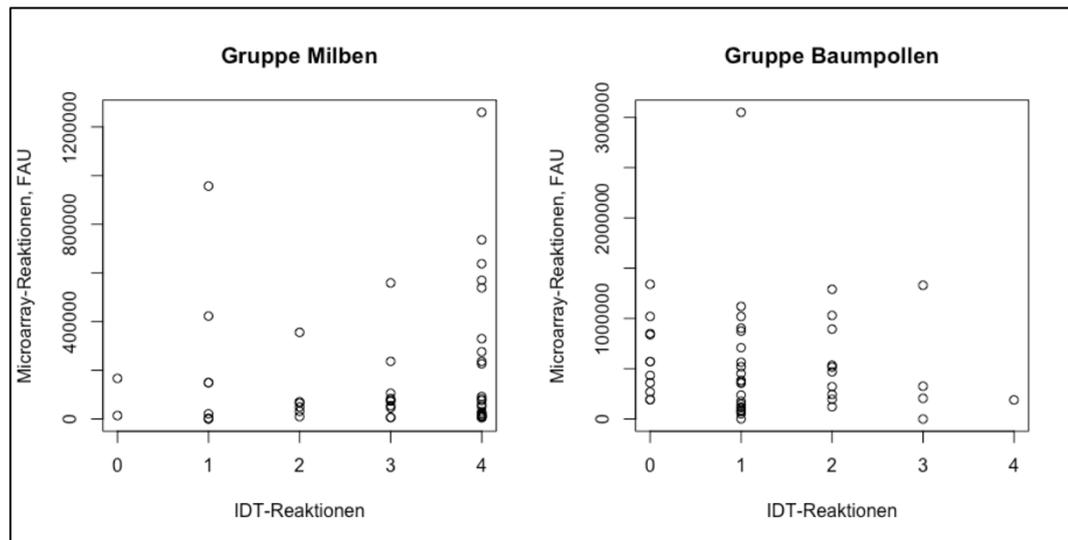


Abbildung 7: Reaktionen der Studienteilnehmer in Intradermaltest und Allergen-Microarray auf die Gruppe der Milbenallergene. Jeder Punkt steht für die Reaktion eines Patienten. Die x-Achse zeigt die Reaktion des Patienten im Intradermaltest an (0 entspricht einer Reaktion vergleichbar der negativ Kontrolle, 4 vergleichbar der positiv Kontrolle), die y-Achse die Reaktion im Allergen-Microarray. (IDT = Intradermaltest) (IDT = Intradermaltest; FAU = fluorescence arbitrary units)

Tabelle 9: Korrelationskoeffizienten nach Kendall und Spearman ausgewählter Allergene von Intradermaltest und Microarray. Ein Wert von 1 beziehungsweise -1 bedeutet eine maximale Korrelation der verglichenen Werte, 0 bedeutet keine Korrelation. Als relevante Korrelation wird ein Wert $> 0,8$ beziehungsweise $< -0,8$ angesehen.

<i>Allergen/-gruppe</i>	<i>Korrelationskoeffizient</i>	
	<i>nach Kendall</i>	<i>nach Spearman</i>
<i>Dermatophagoides farinae</i>	0,1344	0,1739
<i>Aspergillus</i>	-0,0292	-0,0339
Spitzwegerich	0,1421	0,1855
Buche	0,0039	0,0011
Gruppe Milben	0,1261	0,1572
Gruppe Baumpollen	-0,0868	-0,1178

2.3. Beziehung von Microarray und Klinik

Betrachtet wurden die Reaktionen der Hunde im Microarray auf die Allergengruppe der Milben. Abbildung 8 zeigt vergleichend die Reaktionen der Tiere mit saisonalem Juckreiz und ganzjährigem Juckreiz. Beide Gruppen zeigten ähnlich starke Reaktionen und ein annähernd gleiches Verteilungsmuster, Ausreißer nach oben gibt es bei beiden Gruppen nur wenige. In der Gruppe der Tiere mit saisonalem Juckreiz liegt der Median bei 203 000 FAU, die Gruppe der Tiere mit ganzjährigem Juckreiz hat ihren Median bei 98 500 FAU. Der Maximalwert ist in der Gruppe der Hunde mit ganzjährigem Juckreiz mit 1 490 000 FAU, höher als in der Gruppe der Tiere mit saisonalem Juckreiz, hier liegt er bei 957 000 FAU. Keine Reaktion zeigte nur ein Tier und zwar aus der Gruppe der Hunde mit saisonalem Juckreiz.

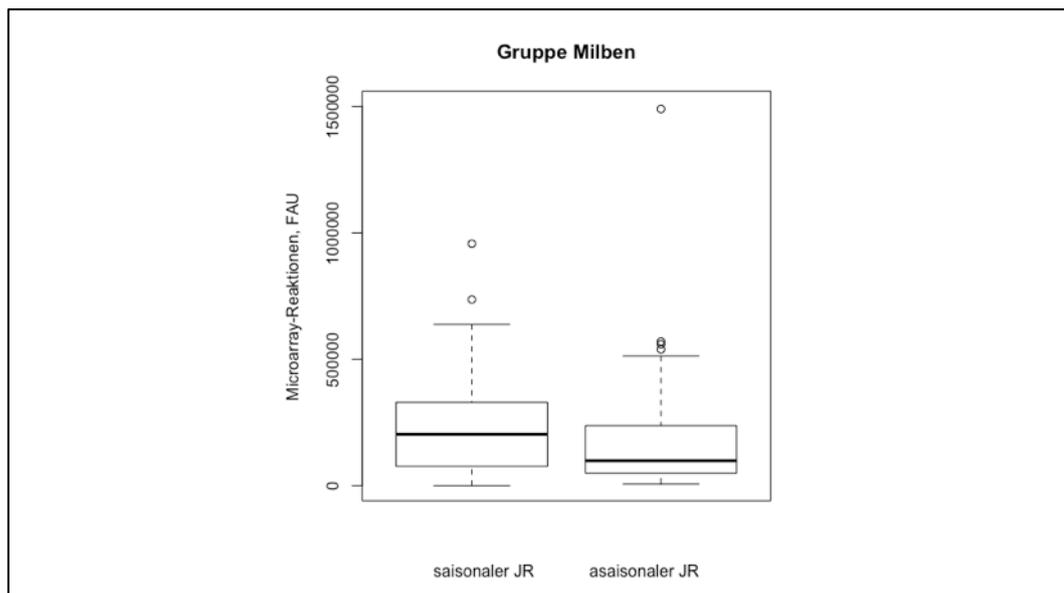


Abbildung 8: Die Grafik zeigt als Boxplot vergleichend die Reaktionen der Studienpatienten mit saisonal und asaisonal auftretendem Juckreiz auf die Gruppe der Milbenallergene im Microarray. (JR = Juckreiz, FAU = fluorescence arbitrary

units)

3. Intradermaltest

3.1. Allergenabhängige Intradermaltest-Reaktionen

Tabelle 10 fasst die prozentualen Anteile der Reaktionen ≥ 2 aller getesteten Allergene im Intradermaltest zusammen.

Die wenigsten Reaktionen im Intradermaltest riefen Allergene der Gruppe Epithelien und ganzjährige Schimmelpilze hervor. Einunddreißig Tiere (64,6 %) zeigten keine Reaktion auf Epithelien und 35 Tiere (72,9 %) keine Reaktion auf ganzjährige Schimmelpilze. Der Anteil der Reaktionen ≥ 2 ist mit 4,2 % bei den Epithelien und mit 10,4 % bei den ganzjährigen Schimmelpilzen äußerst gering.

Betrachtet man die einzelnen Milbenarten ergibt sich folgendes Bild: Am häufigsten positiv reagierten die Studienpatienten auf die Milbenart *Tyrophagus putrescentiae*. 62,5 % der Hunde wurden mit einer Reaktion ≥ 2 auf diese Milbenart bewertet. Der prozentuale Anteil der Reaktionen ≥ 2 liegt bei den anderen Milbenarten niedriger. Auf *Acarus siro* reagierten 60,4 %, auf *Lepidoglyphus destructor* 56,3 % und auf *Dermatophagoides farinae* 50 % der Tiere mit ≥ 2 . Mit 33,3 % weist die Milbenart *Dermatophagoides pteronyssinus* den niedrigsten Anteil an Reaktionen ≥ 2 auf. Auch der Anteil der Reaktionen ≥ 3 ist, mit nur 10,4 %, bei *Dermatophagoides pteronyssinus* deutlich am niedrigsten. Auf *Dermatophagoides farinae* reagierten 41,7 % der Tiere mit ≥ 3 , auf *Tyrophagus putrescentiae* 35,4 % und auf *Lepidoglyphus destructor* 33,3 %.

Fasst man die einzelnen Milbenarten zu einer Gruppe zusammen, riefen die Milbenallergene beim Großteil aller Studienteilnehmer sehr starke Testreaktionen hervor. Wie in Abbildung 9 sichtbar, zeigten 38 Hunde (79,2 %) auf mindestens eine Milbenart eine Reaktion ≥ 2 , mit ≥ 3 reagierten immer noch 32 Tiere (66,7%). Lediglich 20,8% der Patienten reagierten bei keiner Milbenart mit einer Reaktion über 1.

Tabelle 10: Prozentualer Anteil positiver Reaktionen der getesteten Allergene im Intradermaltest. Als positiv wurden Reaktionen ≥ 2 gewertet. (spp. = species pluralis)

Allergen	Positive Reaktionen (≥ 2) in %
----------	---------------------------------------

Epithelien	4,2
Schafwolle	2,1
Epithel Mix (Ente, Gans, Huhn)	2,1
Schimmelpilze	10,4
<i>Aspergillus</i>	6,3
<i>Alternaria</i>	4,2
<i>Cladosporium</i>	0,0
Milben	79,2
<i>Tyrophagus putrescentiae</i>	62,5
<i>Acarus siro</i>	60,4
<i>Lepidoglyphus destructor</i>	56,3
<i>Dermatophagoides farinae</i>	52,1
<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	33,3
Baumpollen	31,3
Silberpappel	14,6
Baumpollenmix 1 (Birke, Erle, Hasel)	14,6
Baumpollenmix 2 (Stieleiche, Buche, Ulme)	14,6
Buche	10,4
gemeine Hasel	8,3
Gräserpollen	52,1
Wiesenfuchsschwanz	25,0
Knäuelgras	20,8
gemeine Quecke	14,6
Weidelgras	14,6
Wiesenrispengras	14,6
Hundszahngras	14,6
wolliges Honiggras	14,6
weißes Straußgras	12,5
Kräuterpollen	62,5
Ambrosie	22,9
Kräuterpollenmix (Beifuß, Brennnessel, Löwenzahn, Spitzwegerich)	22,9
Spitzwegerich	20,8
Glaskraut	20,8
Beifuß	18,8
weißer Gänsefuß	14,6
echte Goldrute	12,5
kleiner Sauerampfer	8,3
Sonstige	
Raps	16,7

Mosquito aedes	22,9
Tabanus	22,9
<i>Culicoides</i> spp.	16,7
Kakerlake	8,3
Stubenfliege	6,3
<i>Culex</i> spp.	6,3

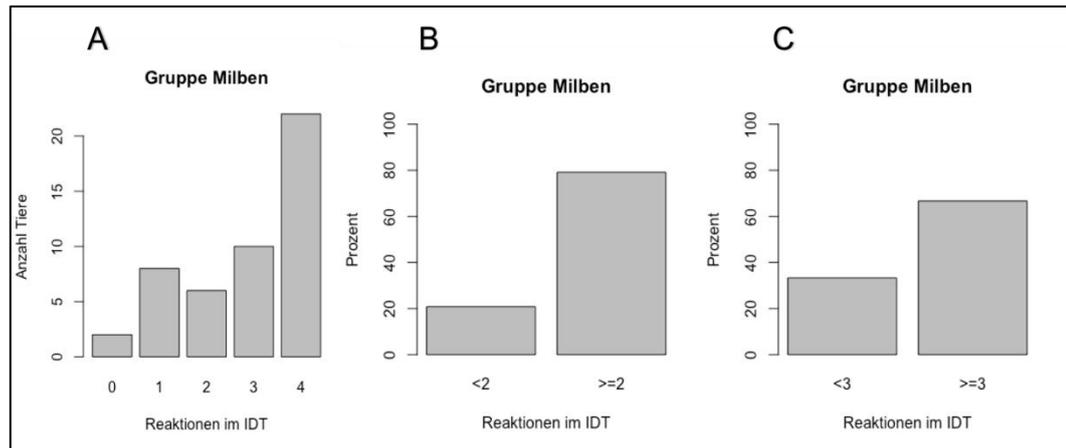


Abbildung 9: Grafik A) zeigt die Reaktionen der Studienteilnehmer im Intradermaltest auf die Gruppe der Milbenallergene. Grafik B) und C) zeigen jeweils die prozentuale Verteilung der Testreaktionen ≥ 2 bzw. ≥ 3 auf Milbenallergene. (IDT = Intradermaltest)

3.2. Lebensraum

Im Fragebogen wurde der Lebensraum der Hunde abgefragt. Siebenundzwanzig Besitzer (56,3 %) gaben an mit ihrem Hund in einer ländlichen Umgebung zu leben. Die restlichen 21 Hunde (43,8 %) wurden in der Stadt gehalten. Abbildung 10 zeigt die Reaktionen der Hunde im Intradermaltest auf saisonale Allergene, aufgeteilt nach Lebensraum. Die auf dem Land gehaltenen Hunde zeigten statistisch signifikant (P -Wert 0,0135) häufiger sehr starke Reaktionen (≥ 3) im IDT als die in der Stadt lebenden Hunde. Während bei den in der Stadt lebenden Hunden nur 7,4 % eine Reaktion ≥ 3 im Intradermaltest zeigten, waren es bei den auf dem Land gehaltenen Studienpatienten 38,1 %. Der Anteil der Reaktionen ≥ 2 ist jedoch mit 81 % auf dem Land und ca. 74,1 % in der Stadt ähnlich groß. Bei ganzjährigen Allergenen (Milben, Epithel, ganzjährige Schimmelpilze) ließ sich kein wesentlicher Unterschied bei der Verteilung der IDT-Reaktionen zwischen den in der Stadt und auf dem Land gehaltenen Hunden feststellen.

3.3. Beziehung von Intradermaltest und Klinik

Alle Studienpatienten zeigten Juckreiz als klinisches Symptom der atopischen Dermatitis. Wie in Abbildung 11 A zu erkennen ist, wies der Großteil der Studienpatienten, nämlich 70,8 %, einen asaisonalen Verlauf des Juckreizes auf. Die restlichen 29,2 % waren mindestens in einem Quartal juckreizfrei. Etwas weniger als die Hälfte (47,9 %) der Hunde zeigten über das Jahr hinweg keine Veränderung der Juckreizintensität, sie wiesen also in keinem Quartal einen Peak in der Klinik auf (Abbildung 11 B). Bei 52,1 % der Tiere bemerkten die Besitzer in einem oder mehreren Quartalen eine Verschlimmerung (Peak) des Juckreizes.

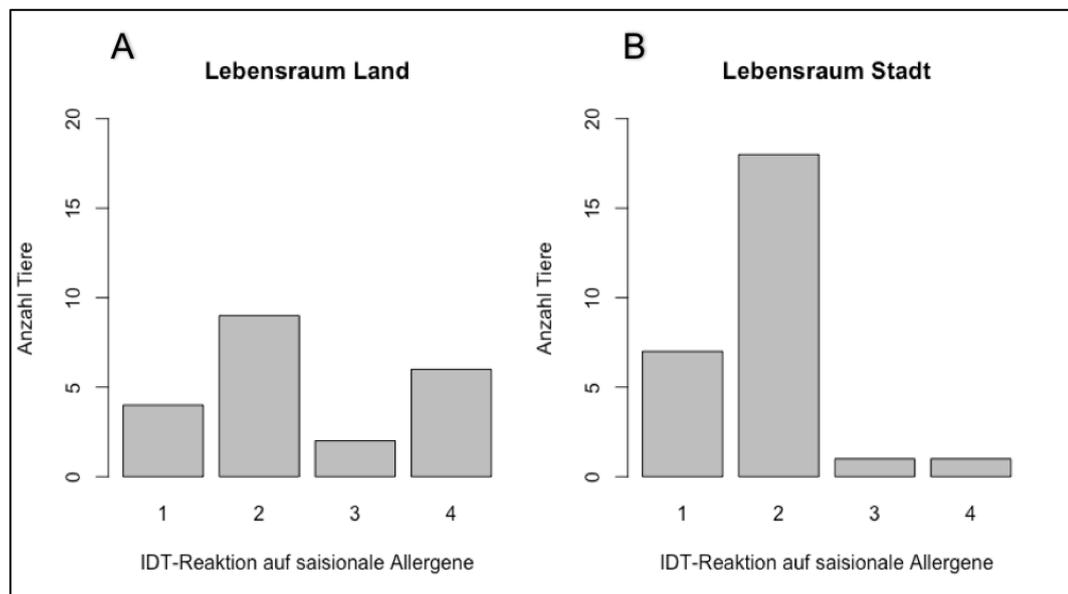


Abbildung 10: Die Abbildung zeigt die Intradermaltest-Reaktionen auf saisonale Allergene (Baumpollen, Gräserpollen, Kräuterpollen, saisonale Schimmelpilze) der in ländlicher Umgebung lebenden Hunde (A) und in der Stadt gehaltenen Hunde (B). (IDT = Intradermaltest)

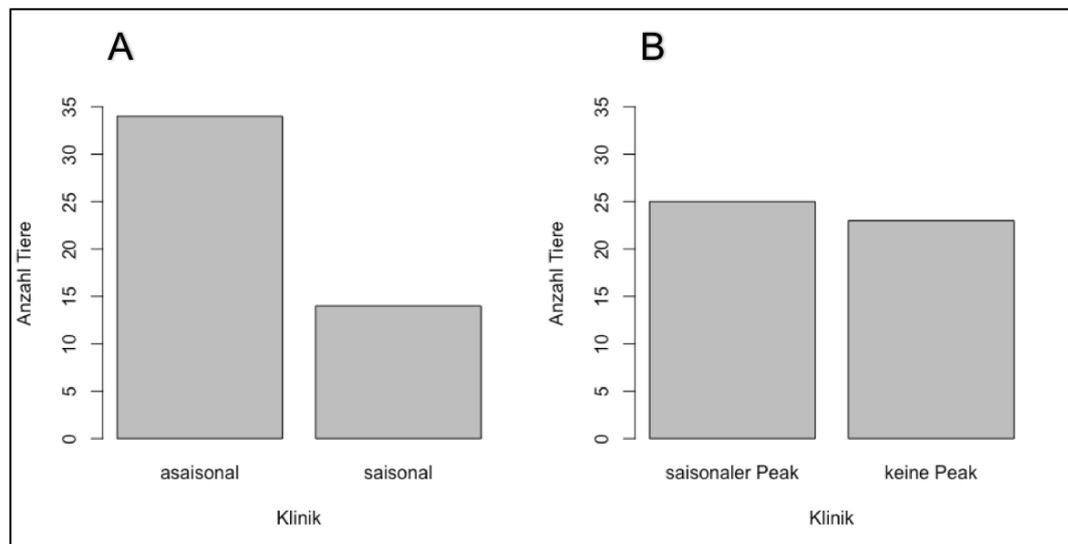


Abbildung 11: A) Darstellung der Saisonalität. 34 Tiere zeigten einen ganzjährigen Verlauf der caninen Atopischen Dermatitis, 14 Patienten zeigten nur saisonale Allergiesymptome. **B)** 25 Tiere zeigten in einem oder mehreren Quartalen eine Verschlechterung des Juckreizes (saisonaler Peak). Bei 23 Tiere bemerkten die Besitzer keine Veränderungen in der Juckreizintensität (kein Peak).

3.3.1. Reaktion auf ganzjährige Allergene

In Abbildung 12 werden die Reaktionen der Studienteilnehmer im Intradermaltest gegenüber ganzjährig vorkommenden Allergenen (Tabelle 6) betrachtet. In der Gruppe der Tiere mit ganzjährig vorhandener Juckreizsymptomatik zeigten 85,3 % der 34 Patienten eine Reaktion ≥ 2 . In der kleineren Gruppe der 14 Studienpatienten mit saisonalem Juckreiz reagierten 64,3 % mit Testergebnissen ≥ 2 . Es ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied (P -Wert 0,1299) zwischen den beiden Gruppen bei den positiven Testreaktionen auf ganzjährige Allergene. Betrachtet man nur die Reaktionen ≥ 3 in den beiden Gruppen, ergibt sich auch hier kein signifikanter Unterschied (P -Wert 0,3153). In der Gruppe der Tiere mit ganzjährigem Juckreiz reagierten 73,5 % mit ≥ 3 , in der Gruppe der Tiere mit saisonaler Juckreizsymptomatik 57,1 %. Spaltet man die Gruppe der ganzjährigen Allergene in Milben, Epithelien und ganzjährige Schimmelpilze auf, ist zu sehen, dass bei den Patienten mit saisonalem Juckreiz alleine die Milben die Reaktionen ≥ 2 hervorrufen. Keiner der 14 Hunde reagierte auf Epithelien oder ganzjährige Schimmelpilze mit einer Reaktion über 1.

3.3.2. Reaktion auf saisonale Allergene

Abbildung 13 stellt die Reaktionen im Intradermaltest gegen saisonale Allergene (Tabelle 6) dar. Betrachtet wurde einmal die Reaktion der Gruppe der Tiere, die eine Verschlechterung des Juckreizes im Frühjahr, Sommer und/oder Herbst (Peak FSH) im Vergleich zum Winter zeigten ($n = 13$). Der Anteil der Reaktionen ≥ 2 gegen saisonale Allergene liegt bei diesen Hunden bei 76,9 % und ist im linken Balken der Grafik dargestellt. Der rechte Balken zeigt die Reaktionen der Tiere die keine saisonale Verschlechterung des Juckreizes zeigten (kein Peak). Damit vom Besitzer eine Verschlechterung auch sicher bemerkt werden konnte, wurden hier nur Tiere berücksichtigt, die leichten bis mittelschweren Juckreiz aufwiesen. 81,3 % dieser 16 Hunde zeigten Reaktionen ≥ 2 auf saisonale Allergene. Zwischen den beiden Gruppen ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied (P -Wert

1,00) bei den positiven Testreaktionen auf saisonale Allergene. Betrachtet man in den beiden Gruppen nur die Reaktionen ≥ 3 , sieht man auch hier keinen signifikanten Unterschied (P -Wert 0,6628). In der Gruppe der Tiere ohne Peak zeigten 25 % eine Reaktion ≥ 3 , in der Gruppe der Tiere mit saisonaler Verschlechterung im Frühjahr, Sommer und/oder Herbst 15,4 %.

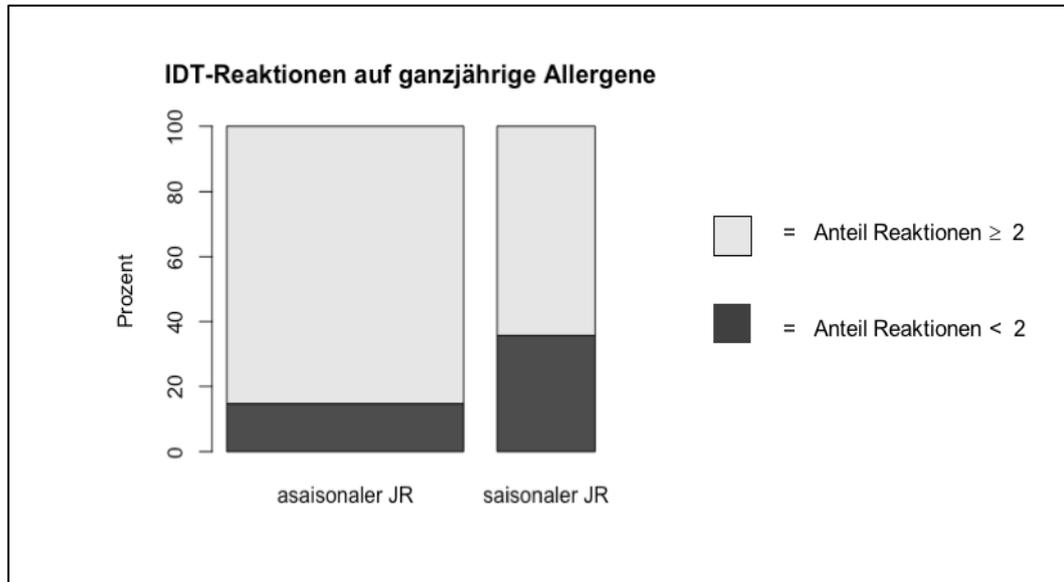


Abbildung 12: Reaktionen im Intradermaltest gegenüber ganzjährigem Allergenen. Der linke Balken zeigt die Reaktionen der Tiere mit ganzjährigem Juckreiz ($n = 34$), der rechte zeigt die Reaktionen der Hunde mit saisonalem Juckreiz ($n = 14$). Die Breite der Balken spiegelt die Gruppengröße wider. Der schwarze Abschnitt stellt den Anteil der Reaktionen < 2 dar, der graue Teil die Reaktionen ≥ 2 . (IDT = Intradermaltest, JR = Juckreiz)

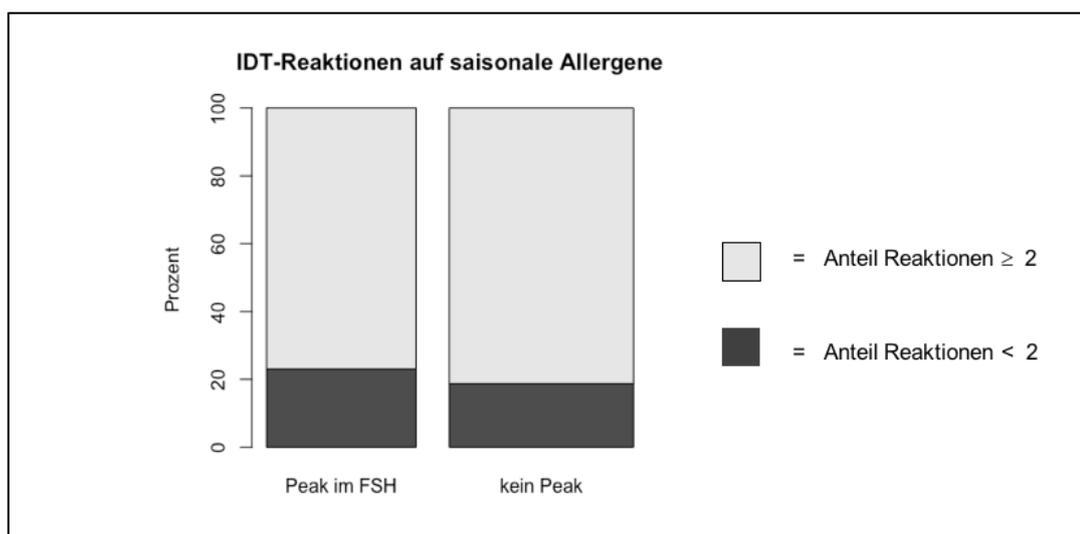


Abbildung 13: Reaktionen im Intradermaltest gegenüber saisonalen Allergenen. Der linke Balken zeigt die Reaktionen der Tiere mit saisonaler Juckreizverschlechterung im Frühjahr, Sommer und/oder Herbst (Peak im FSH,

n = 13), der rechte Balken zeigt die Reaktionen der Hunde die keine Verschlechterung des Juckreizes zeigten und nur leichten bis mittelschweren Juckreiz aufwiesen (kein Peak, n = 16). Die Breite der Balken spiegelt die Gruppengröße wider. Der schwarze Abschnitt stellt den Anteil der Reaktionen < 2 dar, der graue Teil die Reaktionen ≥ 2 . (IDT = Intradermaltest, FSH = Frühjahr, Sommer und/oder Herbst)

V. DISKUSSION

1. Ziel der Studie

Ziel dieser Studie war es, die Ergebnisse eines Allergen-Microarrays zur Bestimmung der allergieauslösenden Allergene mit denen des Intradermaltests zu vergleichen und die Korrelation der Intradermaltest Ergebnisse mit der Klinik der Patienten zu überprüfen. In der Tiermedizin gilt der Intradermaltest bisher als „Goldstandard“ in der Tiermedizin zur Bestimmung der allergieauslösenden Allergene für eine Immunotherapie (HILLIER & DEBOER, 2001; POPIEL & CEKIERA, 2015). Dazu wurde bei 48 Hunden mit atopischer Dermatitis jeweils ein Intradermaltest und ein Allergen-Microarray durchgeführt. Außerdem füllten die Besitzer einen ausführlichen Fragebogen zur Klinik ihres Hundes aus. Die Ergebnisse der Tests wurden sowohl miteinander verglichen als auch mit der Klinik korreliert.

2. Geschlechts- und Rasseverteilung

In dieser Studie ergab sich mit 20 weiblichen und 28 männlichen Hunden ein annähernd ausgeglichenes Geschlechterverhältnis. Dies deckt sich mit der Aussage vieler Studien, die keine Geschlechtsprädisposition bei der caninen atopischen Dermatitis feststellen konnten (SARIDOMICHELAKIS et al., 1999; NØDTVEDT et al., 2006; PICCO et al., 2008).

Laut mehrerer Studien sind einzelne Rassen für die Entwicklung einer caninen atopischen Dermatitis prädisponiert (NØDTVEDT et al., 2006; PICCO et al., 2008; JAEGER et al., 2010). Diese Prädisposition scheint jedoch starken geographischen Schwankungen zu unterliegen. An dieser Studie nahmen elf Mischlinge und 22 verschiedene Hunderassen teil. Davon zählten zehn Hunderassen zu den laut oben genannten Studien prädisponierten Rassen. Vertreten waren sechs Labrador Retriever, fünf Französische Bulldoggen, vier Boxer, zwei Golden Retriever, zwei Jack Russell Terrier, eine Englische Bulldogge, ein Rhodesian Ridgeback, ein Toy-Pudel, ein Welsh Terrier und ein West Highland White Terrier. Somit gehörten in dieser Studie 50 % der Tiere zu einer der für canine AD prädisponierten Rassen. Die große Anzahl an Mischlingen (22,9 %) zeigt, dass nicht nur Rassehunde von der AD betroffen sind. Auf Grund der geringen Anzahl der Studienteilnehmer sind

diese Zahlen jedoch wenig repräsentativ.

3. Testreaktionen der Studienpatienten im Allergen-Microarray

Die Untersuchung der Testreaktionen des Allergen-Microarrays erfolgte an ausgewählten Allergenen. Es wurden nur die Allergene bzw. Allergengruppen untersucht, welche auch im Intradermaltest getestet wurden, um so einen Vergleich der Testreaktionen zu ermöglichen. In Tabelle 8 sind die prozentualen Anteile der Reaktionen > 0 FAU im Microarray dargestellt. Bei deren Betrachtung fällt auf, dass der Anteil der Tiere mit nachgewiesener Fluoreszenz bei den untersuchten Allergenen größtenteils sehr hoch ist. Beim Wiesenrispengras konnte beispielsweise bei 100 % der Studienpatienten eine Fluoreszenz auf der Testplatte gemessen werden, bei den einzelnen Schimmelpilzen ist der Anteil mit 88-94 % nur wenig geringer. Ein derart hoher Prozentsatz an sensibilisierten Tieren und klinisch relevanten Reaktionen scheint eher unwahrscheinlich. Um eine Aussage darüber treffen zu können, ab welchem Wert die gemessene Fluoreszenz und die dadurch bestimmte Menge an nachgewiesenen allergenspezifischen IgE-Antikörpern als klinisch relevant eingestuft werden kann, ist es notwendig, die Reaktionen einer genügend großen Anzahl von nicht atopischen Hunden zu bestimmen. Bisher gibt es keine veröffentlichten Daten zur Untersuchung der Reaktionen gesunder Hunde im Allergen-Microarray. Die Bestimmung eines Cut-off-Wertes für eine positive Reaktion ist aus diesem Grund nicht möglich und das Fehlen einer nicht-atopischen Kontrollgruppe ist als Limitation dieser Studie anzusehen.

Um einen Eindruck über die Aussagekraft des Allergen-Microarrays zur Bestimmung der allergieauslösenden Allergene bei atopischen Hunden zu erhalten, wurden die Ergebnisse der Allergene verglichen, die sowohl im Intradermaltest als auch im Microarray getestet wurden. Bei keinem der getesteten Allergene konnte eine Korrelation der Reaktionen der einzelnen Patienten festgestellt werden. In Abbildung 6 sind beispielhaft die Reaktionen von vier Allergenen graphisch dargestellt. Häufig produzierten Tiere, die im Intradermaltest keine Reaktion auf das Allergen zeigten, extrem hohe Werte im Microarray. Genauso gab es aber auch Patienten, die bei einem Allergen im Microarray keine oder nur geringe Fluoreszenz zeigten, im Intradermaltest jedoch auf dasselbe Allergen mit einer sehr starken Reaktion reagierten. Ein ähnliches Bild ergibt sich beim Vergleich der

Ergebnisse von Allergen-Gruppen. Auch hier lässt sich keine Korrelation zwischen Intradermaltest und Microarray feststellen. Betrachtet man diese Ergebnisse unter dem Aspekt, dass der Intradermaltest derzeit den „Goldstandard“ zur Bestimmung der allergieauslösenden Allergene bei der caninen atopischen Dermatitis darstellt, muss die Aussagekraft des Microarrays bezüglich dieser Fragestellung als eher gering eingeschätzt werden.

Allerdings müssen hierbei einige Punkte bedacht werden. Erstens weist auch der Intradermaltest weder 100 % Sensitivität noch 100% Spezifität auf. Studien lieferten unterschiedliche Angaben bezüglich Spezifität und Sensitivität (HILLIER & DEBOER, 2001; FOSTER et al., 2003). Auch der Intradermaltest produziert regelmäßig falsch positive und falsch negative Ergebnisse (LIAN & HALLIWELL, 1998; MUELLER et al., 2005). Der Intradermaltest ist zwar derzeit der beste kommerziell verfügbare Test, jedoch selbst nicht unfehlbar.

Zweitens werden in den verwendeten Tests unterschiedliche Komponenten einer IgE-mediierten Immunantwort gemessen. Im Intradermaltest wird die Hypersensitivität über die Ig-abhängige Mastzelldegranulation bestimmt. Der Allergen-Microarray misst hingegen die zirkulierenden allergenspezifischen IgE-Antikörper. Die fehlende Korrelation könnte teilweise dadurch bedingt sein. Der Intradermaltest korreliert auch nicht zu hundert Prozent mit den bisher verfügbaren Serumallergietests (MUELLER et al., 1999; FOSTER et al., 2003). Da die derzeitigen *in-vitro* Allergietests und der Allergen-Microarray beide die zirkulierenden IgE-Antikörper messen, könnte es bei einem Vergleich dieser Testmethoden zu einer Korrelation der Ergebnisse kommen. In dieser Studie konnte aus finanziellen Gründen kein zusätzlicher *in-vitro* Allergietest als Vergleich durchgeführt werden.

Ein weiterer Grund für die fehlende Korrelation könnte die unterschiedliche Art der verwendeten Allergene sein. Im Intradermaltest verwendet man als Testlösungen Allergenextrakte. Wie bereits erwähnt, sind solche Allergenextrakte schwer zu standardisieren und können bezüglich ihres Allergengehalts erheblich variieren (HILLIER & DEBOER, 2001). Im Allergen-Microarray wurden hingegen hoch aufgereinigte Proteine auf der Testplatte gespottet. Es kann sein, dass ein Tier zwar auf ein Allergenextrakt reagiert, das für die Sensibilität verantwortliche Protein dieser Allergenquelle jedoch nicht auf der Testplatte getestet wurde bzw. die Konzentration des auslösenden Proteins in der Extraktlösung zu gering ist. Beim

Hund – bzw. bei Tieren allgemein – ist noch wenig über die relevanten Epitope der Allergenquellen bekannt. Während beim Menschen die meisten wichtigen Proteine charakterisiert sind, kennt man beim Hund nur einige wenige Hauptallergene (MUELLER et al., 2016). Relativ gut charakterisiert sind beim Hund die für die Allergie relevanten Epitope der Hausstaubmilbe *Dermatophagoides farinae*. Hier weiß man, dass die Proteine der Gruppe Der f 15 und Der f 18 die Hauptallergene darstellen, im Gegensatz zu Der f 1 und Der f 2 beim Mensch (NUTTALL et al., 2001; MOYA et al., 2016). Der Artikel von Mueller et al. (2016) enthält eine Liste der bisher bestimmten Hauptallergene beim Hund.

Die Verwendung des Allergen-Microarrays zur allergenspezifischen IgE-Detektion steckt in der Tiermedizin noch in den Kinderschuhen. Bisher gibt es keine veröffentlichten Daten zum Einsatz des Allergen-Microarrays beim Hund. Dementsprechend schwierig gestaltet sich die Interpretation der Ergebnisse. Wie bereits erwähnt, ist es nicht klar, ab welchem Wert eine Reaktion im Microarray als positives Ergebnis gewertet werden kann. Durch die Ausarbeitung eines Cut-off-Wertes könnte die Interpretation des Microarrays und der Vergleich mit anderen Testmethoden in Zukunft jedoch deutlich erleichtert werden. Bei nachfolgenden Untersuchungen sollte eine genügend große Kontrollgruppe nicht atopischer Hunde untersucht werden. Die fehlende Kontrollgruppe muss deshalb, wie bereits erwähnt, als Limitation dieser Studie angesehen werden.

Doch nicht nur die fehlenden Cut-off-Werte machen die Interpretation schwierig, sondern auch die bisher noch eingeschränkte Reproduzierbarkeit der Methode. Jahn-Schmid et al. (2003) stellten in ihrer Studie einen nicht unerheblichen Variationskoeffizienten von 25-47 % fest. Um diesen zu ermitteln, führten sie eine Serientestung mit dem Serum sechs verschiedener Patienten durch. Sie stellten sowohl Variationen zwischen verschiedenen Microarray-Testplatten die an einem Tag ausgewertet wurden (slide-to-slide Variation) fest, als auch zwischen Testplatten die an unterschiedlichen Tagen ausgewertet wurden (batch-to-batch Variation). Es konnten sogar Schwankungen von 8-40 % zwischen einzelnen Testfeldern auf einer Microarray-Platte festgestellt werden (within-slide Variation). Diese Probleme bei der Reproduzierbarkeit liegen vermutlich an der Produktion des Microarrays. Dies ist häufig ein kritischer Punkt, da die Immobilisation der Proteine schwierig ist (HARWANEGG & HILLER, 2004; GUPTA et al., 2016). Nach dem Spotten der Proteine sind die Testplatten außerdem sehr empfindlich und müssen

vorsichtig gehandhabt werden, um Artefaktbildungen zu vermeiden (DEINHOFER et al., 2004). Neben der Variabilität innerhalb der Testplatten gibt es beim Microarray auch eine große Inter- und Intraobserver-Variabilität. Damit sind die Varianzen zwischen den Testergebnissen eines Untersuchers an mehreren Tagen und zwischen unterschiedlichen Untersuchern gemeint. Obwohl eine Software die Fluoreszenz der einzelnen Microarray-Spots auswertet, müssen deren Ergebnisse durch einen Untersucher manuell korrigiert werden (HARWANEGG & HILLER, 2004; GUPTA et al., 2016). Die endgültigen Ergebnisse hängen also stark vom jeweiligen Untersucher ab und können große Unterschiede aufweisen.

Um einen Eindruck darüber zu bekommen, ob die Microarray-Reaktionen mit der Klinik der Hunde korrelieren, wurden die Ergebnisse der Hunde mit und ohne ganzjährigem Juckreiz gegenüber Milben verglichen. Im Allgemeinen zeigen Tiere, die auf ganzjährige Allergene – wie beispielsweise Milbenallergene – allergisch reagieren, in der Regel auch das ganze Jahr über Juckreiz. Basierend darauf sollten ganzjährig allergische Tiere im Test auch häufiger Reaktionen auf ganzjährige Allergene produzieren, als die saisonal allergischen Tiere. Wie Abbildung 8 zeigt, ist dies bei den Ergebnissen des durchgeführten Microarrays nicht der Fall. Der Medianwert der Reaktionen liegt in der Gruppe der saisonal allergischen Tiere sogar deutlich höher als in der Gruppe der ganzjährig allergischen Tiere. Es scheint also in diesem Fall keine Übereinstimmung von Klinik und Microarray zu geben.

Diskutiert werden muss, dass in der Gruppe der saisonalen Tiere auch drei Tiere waren, die im Winter Juckreiz zeigten, aber in anderen Quartalen juckreizfrei waren. Hier könnte es sich um Hunde handeln, die zwar auf Milben allergisch sind, deren Symptomatik sich jedoch in den Sommermonaten verbessert, da sich die Tiere hier weniger in geschlossenen und beheizten Räumen aufhalten. Bezieht man diese Tiere jedoch in der Statistik in die Gruppe der ganzjährig allergischen Tiere mit ein, ändern sich die Werte kaum.

Natürlich sollten zur Beurteilung der Korrelation von Microarray und Klinik alle Allergene untersucht werden. Versucht man jedoch, die Hunde in Gruppen mit aussagekräftigem Klinikverlauf einzuteilen, um beispielsweise bei Verschlimmerung des Juckreizes im Frühjahr Frühblüher zu überprüfen, ergeben sich geringe Gruppengrößen und die Aussagekraft ist eher gering. Auch die riesige Anzahl an getesteten und zum Teil für den Hund irrelevanten Allergenen macht einen Vergleich von Klinik und Microarray schwierig.

Die mangelnde Übereinstimmung von Juckreizsymptomatik und Ergebnisse der Milbenallergene, kann aber wie bereits erwähnt, auch durch die Problematik der Reproduzierbarkeit und Durchführung des Tests bedingt sein, wie auch auf Grund der oben beschriebenen falschen Auswahl der Proteine.

Die in dieser Studie erhobenen Daten sprechen dafür, dass der Allergen-Microarray sich noch nicht für den kommerziellen Einsatz in der Allergiediagnostik beim Hund eignet. Eine erste Studie zur Diagnose der Insektenstich-Hypersensitivität beim Pferd mittels Allergen-Microarray lieferte jedoch erfolgversprechende Ergebnisse (MARTI et al., 2015). In der Humanmedizin wird der Allergen-Microarray bereits erfolgreich in der Allergiediagnostik eingesetzt und zeigte in Studien eine gute Korrelation mit gängigen Testverfahren (JAHN-SCHMID et al., 2003; WILLIAMS et al., 2016). Durch die Durchführung weiterer Studien sollte versucht werden die hier diskutierten Probleme weiter zu untersuchen und zu lösen.

4. Testreaktionen der Studienpatienten im Intradermaltest

Betrachtet man die Testreaktionen im Intradermaltest (siehe Tabelle 10), dann zeigten in der Gruppe der Milbenallergene 79,2 % der Studienpatienten eine positive Reaktion (≥ 2), so viel wie in keiner anderen Allergengruppe. Dieser große Prozentsatz konnte auch in anderen Studien festgestellt werden (STURE et al., 1995; SARIDOMICHELAKIS et al., 1999; MUELLER et al., 2000; TASZKUN, 2011; POPIEL & CEKIERA, 2015). Die meisten der Studien identifizierten die Hausstaubmilben *Dermatophagoides farinae* und *Dermatophagoides pteronyssinus* als die häufigsten und wichtigsten Allergene bei der caninen atopischen Dermatitis, sowohl in Europa als auch in den USA und Australien (STURE et al., 1995; MUELLER et al., 2000; HILL & DEBOER, 2001). Die Prävalenz positiver Testreaktionen auf Vorratsmilben wie *Acarus siro*, *Tyrophagus putrescentiae* und *Lepidoglyphus destructor* liegt häufig niedriger als die der Hausstaubmilben (STURE et al., 1995; MUELLER et al., 2000; HILL & DEBOER, 2001). In der vorliegenden Studie zeigt sich jedoch ein umgekehrtes Bild. Hier riefen die Vorratsmilben mehr positive Reaktionen hervor als die Staubmilben. Laut einer Studie von Farmaki et al. (2012) lassen sich *D. farinae* (40-64 %) und *D. pteronyssinus* (35-48 %) deutlich häufiger im Hausstaub nachweisen als die Vorratsmilben (zwischen 5-10 %). Eine Sensibilisierung gegenüber *D. farinae* und *D. pteronyssinus* ist aus diesem Grund vermutlich häufiger festzustellen. Warum

das in der vorliegenden Studie gegenteilig ausfällt, ist schwer zu erklären. Die genannte Studie von Farmaki et al. (2012) wurde in Griechenland durchgeführt. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse könnte man vermuten, dass die Belastung der Haushalte mit Vorratsmilben in Deutschland höher sein könnte. Da Vorratsmilben jedoch hauptsächlich in Haushalten mit hoher Luftfeuchtigkeit und Schimmelbefall nachzuweisen sind (WARNER et al., 1999), scheint diese Vermutung für den deutschen Raum eher unwahrscheinlich. Hier sind Schimmelbefall und hohe Luftfeuchtigkeit eher ein seltenes Problem. Henneveld et al. (2007) konnten in ihrer Studie in Süddeutschland zwar Vorratsmilben im Hausstaub nachweisen, jedoch wurden nur vier Haushalte untersucht und die Aussagekraft ist aus diesem Grund begrenzt. Man könnte außerdem vermuten, dass die Hunde der vorliegenden Studienpopulation häufiger mit Trockenfutter ernährt oder aus großen, undicht verschlossenen Futtersäcken gefüttert wurden als in Populationen anderer Studien und die Hunde so einer höheren Belastung ausgesetzt sind. Gegen diese Vermutung sprechen jedoch die Ergebnisse einer Studie aus Süddeutschland, die keine vermehrte Belastung mit Vorratsmilben in Hundetrockenfutter mit nicht abgelaufenem Haltbarkeitsdatum feststellen konnte (HENNEVELD et al., 2007). Lediglich bei sehr ungünstigen Lagerbedingungen (sehr warm und feucht) kann es zu einer gesteigerten Vermehrung von Vorratsmilben im Trockenfutter kommen (BRAZIS et al., 2008). Über Fütterung und Lagerung der Futtermittel bei den Studienpatienten liegen keine Daten vor. Da es sich bei den verwendeten Testlösungen um Extrakte handelt, ist deren Standardisierung bezüglich ihres Allergengehalts schwierig (HILLIER & DEBOER, 2001). Es könnte also auch sein, dass die verwendeten Testlösungen bei den Vorratsmilben einen höheren Gehalt an Allergen aufwiesen als bei den Hausstaubmilben-Testlösungen. Taszkun stellte in seiner Studie in Polen eine ähnlich hohe Prävalenz von positiven Testreaktionen gegen Vorratsmilben fest wie die vorliegende Studie. Aber auch hier rief *D. farinae* die häufigsten positiven Reaktionen hervor (TASZKUN, 2011). Ein eindeutiger Grund für die hohe Prävalenz positiver Reaktionen auf Vorratsmilben in der durchgeführten Studie lässt sich nicht feststellen.

Betrachtet man den Anteil positiver Reaktionen der Pollengruppen (siehe Tabelle 10), weisen bei den Kräuterpollen 62,5 %, bei den Gräserpollen 52,1 % und bei den Baumpollen 31,3 % der Studienteilnehmer mindestens eine positive Reaktion auf.

Bei den Einzelallergenen dieser Gruppen lag der Prozentsatz positiver Reaktionen zwischen 4 und 25 %. Die Ergebnisse bewegen sich damit im Rahmen der meisten Studien, die generell eine sehr große Spanne aufweisen (DEBOER, 1989; STURE et al., 1995; ZUNIC, 1998; MUELLER et al., 2000; FOSTER et al., 2003; TASZKUN, 2011). Grund dafür sind vermutlich die verschiedenen geographischen Regionen in denen die Studien durchgeführt wurden und die daraus resultierende unterschiedliche Vegetation und Pollenflugzeiten. Jede Studienpopulation ist somit unterschiedlichen Pollen mehr oder weniger lang ausgesetzt. Ein Vergleich der Studienergebnisse ist daher fast unmöglich.

Die Prävalenz positiver Reaktionen lag in der Gruppe Schimmelpilze zwischen 0 und 6,3 % und damit relativ niedrig (siehe Tabelle 10). *Aspergillus* produzierte in dieser Allergengruppe die meisten positiven Reaktionen. Eine Erklärung dafür könnte die überwiegende Entwicklung dieser Schimmelpilzart in Innenräumen darstellen. Da die Tiere dadurch häufiger und in der Regel das ganze Jahr über *Aspergillus*-Antigen ausgesetzt sein können, ist es nicht verwunderlich, dass mehr Tiere eine Sensibilisierung gegenüber *Aspergillus* aufweisen als gegenüber den hauptsächlich in der Umwelt vorkommenden und sehr klimaempfindlichen Schimmelpilzarten *Cladosporium* und *Alternaria*. Diese bevorzugen ein sehr trockenes und warmes Klima und spielen in Deutschland aus diesem Grund wohl eher eine untergeordnete Rolle bei der Entstehung der caninen atopischen Dermatitis.

Auch die Allergene in der Gruppe der Epithelien riefen wenig positive Reaktionen bei den Studienpatienten hervor (siehe Tabelle 10). Sowohl auf Schafwolle als auch auf den Federmix aus Ente, Gans und Huhn reagierten nur 2,1 % der Hunde positiv. In den meisten Studien waren die Reaktionen auf Federn einheitlich niedrig und sie scheinen ein eher geringes allergenes Potential aufzuweisen (SARIDOMICHELAKIS et al., 1999; HILL & DEBOER, 2001; FOSTER et al., 2003).

Im Fragebogen wurde von den Besitzern der Lebensraum ihrer Hunde abgefragt. Etwas mehr als die Hälfte aller Studienteilnehmer wurden in der Stadt gehalten, der Rest in ländlicher Umgebung. Die auf dem Land gehaltenen Hunde reagierten signifikant häufiger ($P = 0,0135$) mit sehr starken Reaktionen (≥ 3) auf saisonale Allergene als die Hunde in der Stadt (siehe Abbildung 10). Der Anteil an

Reaktionen ≥ 2 war jedoch ähnlich groß. Ein Grund dafür könnte sein, dass die auf dem Land gehaltenen Hunde häufiger und länger Pollen von Gräsern, Kräutern und Bäumen ausgesetzt sind, da die Bewuchsdichte auf dem Land deutlich größer ist als in der Stadt. Allerdings sind Graspollen in der Regel sehr leicht und werden vom Wind über viele Kilometer getragen, insofern sind auch Hunde in städtischer Umgebung diesen Pollen ausgesetzt. Des Weiteren suchen viele in der Stadt lebende Hundebesitzer zum Spaziergang mit ihren Hunden ländlichere Gegenden bzw. Parks oder Waldstücke auf, wo die Hunde z. B. auch den schweren Pollen der Nadelhölzer ausgesetzt sind. Das erklärt, warum auch in der Stadt Hunde regelmäßig Pollenreaktionen zeigen, die erhöhte Anzahl der stark positiven Reaktionen bei Landhunden ist vielleicht einfach auf die quantitativ höhere Belastung zurückzuführen.

Um die Aussagekraft der Testreaktionen besser einschätzen zu können, wurden diese mit der Klinik der atopischen Hunde korreliert. Da Juckreiz bei allen Studienteilnehmern als Teil der Allergiesymptomatik auftrat und vom Besitzer einfach und am genauesten zu evaluieren ist, wurde dieser als Messgröße der Klinik verwendet. Als Einschränkung ist zu erwähnen, dass der Juckreiz von den Besitzern retrospektiv beurteilt wurde und eine prospektive Evaluierung durch einen Tierarzt über ein gesamtes Jahr sicherlich einen genaueren Verlauf des Juckreizes geliefert hätte. Aus personellen und finanziellen Gründen war ein derartiger Studienaufbau jedoch nicht umsetzbar.

In 70,8 % der Fälle zeigten die Studienteilnehmer einen nicht-saisonalen Verlauf des Juckreizes. Dies korreliert mit den Ergebnissen anderer Studien, in denen ebenfalls ein Großteil der atopischen Hunde eine asaisonale Juckreizproblematik zeigte (SARIDOMICHELAKIS et al., 1999; BRUET et al., 2012). Wenn bedacht wird, dass die Milben als ganzjährige Allergene die größte Rolle in der Entstehung allergischer Symptome spielen, ist dies nicht verwunderlich.

Um die Aussagekraft der positiven Reaktionen auf ganzjährig vorkommende Allergene zu evaluieren, wurde der Anteil an positiven Reaktionen bei Tieren mit und ohne ganzjähriger Juckreizsymptomatik verglichen. Es wäre zu erwarten, dass Tiere, die keinen ganzjährigen Juckreiz zeigen, deutlich weniger auf ganzjährig vorkommende Allergene reagieren als Tiere die auch das ganze Jahr über an Juckreiz leiden. In Abbildung 12 ist jedoch zu sehen, dass dies in der untersuchten Studienpopulation nicht der Fall ist. Die ganzjährigen Allergene produzierten,

sowohl bei Tieren mit ganzjährigem Juckreiz als auch bei Tieren mit saisonalem Juckreizverlauf, einen hohen Prozentsatz positiver Reaktionen. Zwischen beiden Gruppen besteht kein signifikanter Unterschied in der Reaktion auf ganzjährige Allergene.

Bei den vielen positiven Reaktionen der nicht ganzjährig allergischen Tiere könnte es sich um subklinische Sensibilisierungen handeln. In Studien wurde gezeigt, dass auch nicht atopische Hunde häufig positive Reaktionen auf Milbenallergene zeigen (CODNER & TINKER, 1995; LIAN & HALLIWELL, 1998). Lian und Halliwell (1998) gehen davon aus, dass es sich auch bei den gesunden Hunden eher um klinisch irrelevante Sensibilisierungen handelt als um tatsächliche falsch-positive Reaktionen. Zu diesem Schluss gelangen sie auf Grund der Tatsache, dass die Prävalenz positiver Reaktionen bei Hunden, welche unter Forschungsbedingungen gehalten werden, niedriger ist als bei nicht atopischen Tieren in Privatbesitz.

Natürlich wären auch falsch-positive Ergebnisse auf Grund von Irritationen durch zu hohe Allergenkonzentrationen prinzipiell denkbar. Es existieren unterschiedliche Angaben zur optimalen Schwellenkonzentration der Milbenallergene (WILLEMSE & VAN DEN BROM, 1982; CODNER & TINKER, 1995; LIAN & HALLIWELL, 1998). Mit 100 NU/ml liegt die verwendete Konzentration jedoch unterhalb der meisten empfohlenen Werte. Wie bereits mehrfach erwähnt, ist die Standardisierung der Extrakte bezüglich ihres Allergehalts jedoch sehr schwierig. Es ist deshalb nicht auszuschließen, dass die tatsächliche Konzentration in den Allergenlösungen von den Herstellerangaben abweicht. Da der Intradermaltest von erfahrenen und mit der Testmethode vertrauten Dermatologen durchgeführt wurde, sind falsch-positive Testreaktionen auf Grund von fehlerhafter Injektionstechnik unwahrscheinlich. Anzumerken ist, dass die Auswertung des Intradermaltests auf der Grundlage des subjektiven Verfahrens (Abschnitt II.2.2) erfolgte. Hubbard und White (2011) verglichen in ihrer Studie das objektive und subjektive Auswertungsverfahren miteinander. In 27,9 % der Fälle wurde eine Reaktion mit dem subjektiven Verfahren als positiv gewertet, während diese mit dem objektiven Verfahren als negativ eingestuft wurde. Das verwendete subjektive Verfahren zur Auswertung des Intradermaltests könnte also zur Entstehung von falsch-positiven Ergebnissen geführt haben.

Es kommt vor, dass manche milben-allergische Tiere in den Sommermonaten keine Klinik zeigen, da sie sich zu dieser Jahreszeit hauptsächlich draußen aufhalten und

dort die Belastung mit Milbenallergenen deutlich geringer ist. Diese „untypischen“ Milbenallergiker könnten fälschlicherweise in Gruppe der Tiere mit saisonalem Juckreiz eingeordnet worden sein. Dies könnte ein weiterer Grund für die hohe Prävalenz positiver Reaktionen in der Gruppe der saisonal allergischen Tiere sein.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass positive Reaktionen im Intradermaltest nicht zwingend als klinisch relevant angesehen werden können und nur bei Übereinstimmung mit der Klinik als positiv gewertet werden können. Die Reaktionen auf ganzjährig vorkommende Schimmelpilze und Epithelien scheinen diesbezüglich aussagekräftiger zu sein. Darauf zeigte kein Tier mit saisonaler Juckreizsymptomatik eine positive Reaktion im Intradermaltest.

Auf Grund der hohen Prävalenz an positiven Reaktionen in beiden Gruppen wurde untersucht, ob die Aussagekraft erhöht werden kann, wenn der Cut-off-Wert für eine positive Reaktion auf ≥ 3 angehoben wird. Der Anteil an Reaktionen ≥ 3 ist jedoch in beiden Gruppe sehr hoch und es lässt sich auch hier kein signifikanter Unterschied feststellen. Ein Anheben des Cut-off-Wertes für eine positive Reaktion im Intradermaltest auf ≥ 3 scheint die Aussagekraft nicht zu erhöhen und wird aus diesem Grund von der Autorin als nicht sinnvoll erachtet.

Neben den ganzjährigen Allergenen wurde auch die Aussagekraft positiver Reaktionen auf saisonale Allergene (Tabelle 6) betrachtet. Saisonal vorkommende Allergene rufen, ihrer Pollenflugzeit entsprechend, nur zeitlich begrenzte allergische Reaktionen hervor. Reagiert ein atopischer Patient also allergisch auf ein saisonales Allergen, bemerkt der Besitzer in der Regel eine Verschlechterung des Juckreizes. Dies wird hier als Peak bezeichnet. In der vorliegenden Studie zeigten 13 Hunde eine solche Verschlechterung des Juckreizes im Frühjahr, Sommer und Herbst im Vergleich zum Winter. Entsprechend ihrer Klinik sollten diese Tiere mindestens auf ein saisonal vorkommendes Allergen allergisch sein und im Intradermaltest positiv auf ein solches reagieren. Tiere, die das ganze Jahr über eine stabile Juckreizsymptomatik zeigen und bei denen der Besitzer keine saisonale Verschlechterung feststellen kann, sollten hingegen nicht auf saisonale Allergene reagieren. Bei 76,9 % der Hunde mit Peak im Frühjahr, Sommer und/oder Herbst konnte mindestens eine positive Reaktion im Intradermaltest gegen saisonale Allergene festgestellt werden. Sechzehn Tiere der Studienpopulation zeigten keinen Peak. In dieser Gruppe lag der Anteil positiver Reaktionen mit 81,3 % sogar höher,

als in der Gruppe mit Peak (siehe Abbildung 13). Es scheint also auch hier, genau wie bei den ganzjährigen Allergenen, kein Zusammenhang zwischen Klinik der Tiere und Intradermaltest-Reaktionen zu bestehen.

Laut einer Studie von Bauer et al. aus dem Jahr 2010 werden selbst durch sehr hohe Allergenkonzentrationen bei klinisch gesunden Hunden kaum falsch-positive Testreaktion durch Pollenextrakte ausgelöst. Der Schwellenwert für eine Irritation durch das Allergen liegt bei den Pollen also deutlich höher als bei den Milbenallergenen (BAUER et al., 2010). Es handelt sich bei den Hunden ohne Peak vermutlich hauptsächlich um subklinische Sensibilisierungen und weniger um tatsächlich falsch positive Testreaktionen.

Falsch-positive Reaktionen durch fehlerhafte Injektionstechnik scheinen, wie bereits erwähnt, eher unwahrscheinlich. Es ist aber möglich, dass die subjektive Auswertung, wie oben diskutiert, zu einer Überinterpretation der Reaktionen geführt hat (HUBBARD & WHITE, 2011).

Eine weitere Ursache für die vielen positiven Reaktionen in der Gruppe der Hunde ohne Peak könnte sein, dass die Besitzer eine Verschlechterung des Juckreizes nicht bemerkten und diese Tiere so der falschen Gruppe zugeordnet wurden. Um dieses Risiko zu minimieren, wurden nur Tiere mit leichtem oder mittelschwerem Juckreiz berücksichtigt, da eine Verschlechterung vor allem dann schwer zu bemerken ist, wenn der Juckreiz schon anfänglich sehr stark ist.

Genau wie bei den ganzjährigen Allergenen wurde die Anhebung des Cut-off-Wertes für positive Reaktionen auf ≥ 3 untersucht. Da aber auch hier kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen besteht, wird dies als nicht sinnvoll erachtet.

Limitierend bei der Auswertung der Intradermaltest-Reaktionen unter Einbezug der Klinik ist zu erwähnen, dass 33,3 % der Studienteilnehmer zusätzlich zur Umweltallergie an einer Futtermittelallergie leiden. Da die Futtermittelallergie sowohl zu akuten Schüben der atopischen Dermatitis als auch zu ganzjährigem Juckreiz bei den Patienten führen kann (OLIVRY et al., 2007; PICCO et al., 2008; FAVROT et al., 2010), ist der Juckreizverlauf dieser Tiere nur beschränkt der Umweltallergie zuzuordnen. Aus diesem Grund wurde die statistische Auswertung der Reaktionen auf ganzjährige und saisonale Allergene zusätzlich unter Ausschluss der futtermittelallergischen Hunde durchgeführt. Diese Ergebnisse

wichen jedoch kaum von den hier diskutierten Ergebnissen ab und sind aus diesem Grund in der Arbeit nicht zusätzlich dargestellt. Es ergab sich auch hier keine statistische Signifikanz zwischen den Gruppen. Die zusätzliche Futtermittelallergie scheint also keinen Einfluss auf die Auswertung der Ergebnisse zu haben.

Die vorliegenden Ergebnisse verdeutlichen, dass die Korrelation von Klinik und Intradermaltest-Ergebnissen als gering zu bewerten ist. Es ist allgemein bekannt, dass die positiven Reaktionen im Intradermaltest nicht zwingend als klinisch relevant angesehen werden können, sondern es sich auch um falsch positive Reaktionen bzw. subklinische Sensibilisierungen handeln kann (HILLIER & DEBOER, 2001). Über die Prävalenz klinisch nicht-relevanter Reaktionen existieren jedoch keine Angaben. Aus diesem Grund ist die in der vorliegenden Studie festgestellte, ausgesprochen hohe Prävalenz überraschend. Da der IDT die allergenspezifische IgE-medierte Mastzelldegranulation und damit eine Typ-I-Hypersensitivitätsreaktion widerspiegelt, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass sich der Nachweis der IgE-medierte Immunantwort nur bedingt zur Identifikation der AD auslösenden Allergene eignet.

Ein Grund dafür könnte sein, dass die canine atopische Dermatitis keine rein IgE-medierte Erkrankung ist. Wie weiter oben ausführlich beschrieben wird, spielen viele immunologische Vorgänge in der Pathogenese der atopischen Dermatitis eine Rolle, unter anderem eine Lymphozyten-abhängige Immunantwort (MARSELLA et al., 2012; PUCHEU-HASTON et al., 2015).

Dass die IgE-medierte Immunantwort nicht im Vordergrund der klinischen Symptomatik steht, wird auch durch Effekte bei der Allergen-Immunotherapie deutlich. Einige Studien in der Humanmedizin und Tiermedizin zeigten, dass es während den ersten Monaten der AIT zwar zu einem Anstieg der allergenspezifischen IgE-Antikörper kommen kann, die klinische Verbesserung zu diesem Zeitpunkt jedoch bereits einsetzt (VAN REE et al., 1997; FOSTER et al., 2002; LAUBER et al., 2012). Dies lässt vermuten, dass die klinische Verbesserung bei der Immunotherapie nicht hauptsächlich durch eine Modifikation der IgE-medierte Immunantwort entsteht, sondern über alternative immunologische Mechanismen. Dafür spricht ebenfalls, dass sich auch mit Immunotherapien bei denen kein IDT oder SAT zur Identifikation der Allergene durchgeführt wurde gute Erfolge erzielen lassen. Plant et al. (2017) konnten beispielsweise mit einer auf die regional vorkommenden Allergene abgestimmten Immunotherapie (regionally-

specific immunotherapy = RESPIT) eine ähnliche Verbesserung der Patienten erzielen wie mit der traditionellen allergenspezifischen Immunotherapie. Unveröffentlichte Daten zeigten außerdem erste Erfolge einer allergenunspezifischen Immunotherapie mit Gelatinenanopartikel-gebundenen CpG (Cytosin-Phosphat-Guanin)-Oligodesoxynukleotiden bei Hunden mit atopischer Dermatitis.

Eine Auswahl der Allergene für eine AIT durch Bestimmung der allergenspezifischen IgE-Antikörper der Patienten kann unter diesen Gesichtspunkten in Frage gestellt werden. Zur Identifikation der allergieauslösenden Allergene bei der caninen Futtermittelallergie eignet sich der Nachweis einer allergenspezifischen Typ-IV-Hypersensitivitätsreaktion durch einen Lymphozytenproliferationstest deutlich besser als Serum-IgE-Test oder IDT. Dies zeigten verschiedene Studien auf (ISHIDA et al., 2004; FUJIMURA et al., 2011; KAWANO et al., 2013). Die Forschung und Entwicklung alternativer Testmethoden für die Diagnose und Allergenbestimmung bei der atopischen Dermatitis bzw. allergenunspezifischer Immunotherapien sollte aus diesem Grund weiter vorangetrieben werden

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchung der Testreaktionen in Allergen-Microarray und Intradermaltest von Hunden mit atopischer Dermatitis unter Berücksichtigung der allergisch bedingten Juckreizsymptomatik

Die canine atopische Dermatitis (AD) ist eine juckende und entzündliche Hauterkrankung, bedingt durch eine genetische Überempfindlichkeit gegenüber diversen Antigenen. Lange Zeit wurde die AD als eine rein IgE-medierte Erkrankung angesehen, heute weiß man aber um die sehr viel komplexere und multifaktorielle Pathogenese dieser Erkrankung. Aus diesem Grund gestaltet sich nicht nur die Diagnose häufig schwierig, sondern auch die Identifikation der auslösenden Allergene für eine therapeutische Immunotherapie. Der Intradermaltest gilt in der Tiermedizin als „Goldstandard“ zur Bestimmung der Allergene, weist aber selbst eine eingeschränkte Sensitivität und Spezifität auf.

Der in der Humanmedizin bereits kommerziell eingesetzte Allergen-Microarray birgt neue Möglichkeiten in der molekularen Allergiediagnostik. Durch die extreme Miniaturisierung des Verfahrens und der großen Anzahl an aufgereinigten oder rekombinant hergestellten Allergenen gelingt die Erstellung genauer Sensibilisierungsprofile jedes Patienten.

Ziel dieser Studie war es, die Aussagekraft des Allergen-Microarrays und Intradermaltests bei atopischen Hunden durch Vergleich der Ergebnisse und unter Berücksichtigung der Klinik, zu evaluieren. Dazu wurde bei 48 diagnostiziert atopischen Hunden jeweils ein Intradermaltest und Allergen-Microarray durchgeführt. Zusätzlich füllten die Besitzer einen detaillierten Fragebogen zum jahreszeitlichen Verlauf der Klinik und Haltungsbedingungen ihres Hundes aus. Die Testergebnisse wurden statistisch ausgewertet und sowohl untereinander wie auch mit der individuellen Juckreizsymptomatik der Hunde korreliert.

Die in der vorliegenden Studie festgestellte Prävalenz positiver Reaktionen auf die einzelnen Allergene im Intradermaltest sind vergleichbar mit den meisten vorhergehenden Studien. Zwischen den Testergebnissen von Microarray und Intradermaltest konnte bei keinem der Allergene eine Korrelation festgestellt werden. Weder bei den Testreaktionen des Microarrays, noch bei denen des Intradermaltests konnte eine statistisch signifikante Übereinstimmung mit dem

jahreszeitlichen Juckreizverlauf der Studienpatienten festgestellt werden.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass der Allergen-Microarray zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht für die Identifikation der AD auslösenden Allergene eignet. Auf Grund der vielversprechenden Ergebnisse humanmedizinischer Studien sollte durch Folgestudien versucht werden, den Allergen-Microarray besser für die Tiermedizin nutzbar zu machen. Die fehlende Korrelation von Klinik und Intradermaltest-Ergebnissen weist darauf hin, dass sich die Messung der IgE-medierte Immunantwort zur Identifikation der auslösenden Allergene nur begrenzt eignet. Bei der Entwicklung und Untersuchung neuer Testmethoden sollte der Fokus deshalb auf alternative pathogenetische Mechanismen der AD, wie beispielsweise die Lymphozyten-medierte Immunantwort, gelegt werden.

VII. SUMMARY

Analysis of test reactions in allergen microarrays and intradermal tests of dogs with atopic dermatitis considering their clinical history

Canine atopic dermatitis (AD) is a pruritic and inflammatory skin disease caused by a genetically predisposed hypersensitivity against miscellaneous antigens. For a long time, AD was considered as a strictly IgE-mediated disease. Today it is established that the pathogenesis of AD is highly complex and multifactorial. For this reason, not only the diagnosis, but also the identification of the offending antigens for allergen immunotherapy can be challenging. Intradermal testing is considered the 'gold standard' for identifying the offending allergens, though the sensitivity and specificity is limited.

The allergen microarray, which is commercially available in human medicine, offers new possibilities in molecular allergy diagnosis. The extreme miniaturization of the system and the huge number of highly purified or recombinant allergens allow creation of an individual sensitization profile of each patient.

The aim of the study was to evaluate the relevance of results obtained by allergen microarray and intradermal testing in atopic dogs through direct comparison of results and correlating results to the patient's history. Allergen microarrays and intradermal testing were performed in 48 atopic dogs. Additionally, all owners completed a detailed questionnaire about the seasonal course of pruritus and their dog's environment. The test reactions of each test were statistically analysed and correlated between the two tests as well as to the individual clinical history of the dog.

The prevalence of positive intradermal test reactions in this study were comparable to the results of previous studies. There was no correlation between the test results of microarray and intradermal testing. Neither microarray results nor intradermal test results correlated with the individual seasonal pruritus course of the study participants.

The results of this study show, that the evaluated allergen microarray is currently not a suitable tool for the identification of the offending allergens in atopic dogs. Due to the promising results of studies in human medicine, further work with

allergen microarrays for atopic dogs seems sensible. The lack of a correlation between intradermal test results and the individual clinical history indicates, that measurement of the IgE-mediated immune response may have limitations for the identification of offending allergens. Alternative pathogenic ways in AD, such as the lymphocyte-mediated immune response, should also be evaluated in more detail in the future.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Agrawal R, Wisniewski JA, Woodfolk JA. The role of regulatory T cells in atopic dermatitis. *Curr Probl Dermatol* 2011; 41: 112-24.

Aloe MM, Galvan EA, Fleck TJ, Humphrey WR, Coscarelli EM, Mahabir SP, McCall RB, Gonzales A. Abstracts of the North American Veterinary Dermatology Forum April 17-20th 2013 Louisville, Kentucky, USA. *Vet Dermatol* 2013; 24: 295-309.

Angenendt P, Glokler J, Murphy D, Lehrach H, Cahill DJ. Toward optimized antibody microarrays: a comparison of current microarray support materials. *Anal Biochem* 2002; 309: 253-60.

Barbet JL, Halliwell RE. Duration of inhibition of immediate skin test reactivity by hydroxyzine hydrochloride in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1989; 194: 1565-9.

Bauer CL, Hensel P, Austel M, Keys D. Determination of irritant threshold concentrations to weeds, trees and grasses through serial dilutions in intradermal testing on healthy clinically nonallergic dogs. *Vet Dermatol* 2010; 21: 192-7.

Bensignor E, Olivry T. Treatment of localized lesions of canine atopic dermatitis with tacrolimus ointment: a blinded randomized controlled trial. *Vet Dermatol* 2005; 16: 52-60.

Bieber T. Atopic dermatitis. *N Engl J Med* 2008; 358: 1483-94.

Bieber T. Many ways lead to Rome: a glance at the multiple immunological pathways underlying atopic dermatitis. *Allergy* 2013; 68: 957-8.

Bizikova P, Santoro D, Marsella R, Nuttall T, Eisenschenk MNC, Pucheu-Haston CM. Review: Clinical and histological manifestations of canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2015; 26: 79-e24.

Blaskovic M, Rosenkrantz W, Neuber A, Sauter-Louis C, Mueller RS. The effect of a spot-on formulation containing polyunsaturated fatty acids and essential oils on dogs with atopic dermatitis. *Vet J* 2014; 199: 39-43.

Boguniewicz M, Leung DY. Atopic dermatitis: a disease of altered skin barrier and immune dysregulation. *Immunol Rev* 2011; 242: 233-46.

Bradley CW, Morris DO, Rankin SC, Cain CL, Misic AM, Houser T, Mauldin EA, Grice EA. Longitudinal Evaluation of the Skin Microbiome and Association with Microenvironment and Treatment in Canine Atopic Dermatitis. *J Invest Dermatol* 2016; 136: 1182-90.

Brandt EB, Sivaprasad U. Th2 Cytokines and Atopic Dermatitis. *J Clin Cell Immunol* 2011; 2: 110.

Brazis P, Serra M, Selles A, Dethioux F, Biourge V, Puigdemont A. Evaluation of storage mite contamination of commercial dry dog food. *Vet Dermatol* 2008; 19: 209-14.

Briot A, Deraison C, Lacroix M, Bonnart C, Robin A, Besson C, Dubus P, Hovnanian A. Kallikrein 5 induces atopic dermatitis-like lesions through PAR2-mediated thymic stromal lymphopoietin expression in Netherton syndrome. *J Exp Med* 2009; 206: 1135-47.

Bruet V, Bourdeau PJ, Roussel A, Imparato L, Desfontis J-C. Characterization of pruritus in canine atopic dermatitis, flea bite hypersensitivity and flea infestation and its role in diagnosis. *Vet Dermatol* 2012; 23: 487-e93.

Cabanillas B, Novak N. Atopic dermatitis and filaggrin. *Curr Opin Immunol* 2016; 42: 1-8.

Carlotti DN, Jacobs DE. Therapy, control and prevention of flea allergy dermatitis in dogs and cats. *Vet Dermatol* 2000; 11: 83-98.

Chervet L, Galichet A, McLean WH, Chen H, Suter MM, Roosje PJ, Muller EJ. Missing C-terminal filaggrin expression, NFkappaB activation and hyperproliferation identify the dog as a putative model to study epidermal dysfunction in atopic dermatitis. *Exp Dermatol* 2010; 19: e343-6.

Clarke K, McCall C, Steffan J, Wassom D. The effects of cyclosporin A and oral prednisolone on flea allergen specific serum IgE an intradermal tests in experimentally sensitized laboratory Beagles. *Vet Dermatol* 2003; 14: 246 (abstract).

Clarke KB, Bevier DE, Radecki SV, McCall CA. The effects of corticosteroid treatment on anti-flea saliva IgE, as measured by intradermal skin test and ELISA, in laboratory beagles with experimentally induced flea allergy dermatitis. *Vet Dermatol* 2000; 11 (Suppl. 1): 50 (abstract).

Clarke SR, Mohamed R, Bian L, Routh AF, Kokai-Kun JF, Mond JJ, Tarkowski A, Foster SJ. The Staphylococcus aureus surface protein IsdA mediates resistance to innate defenses of human skin. *Cell Host Microbe* 2007; 1: 199-212.

Codner EC, Tinker MK. Reactivity to intradermal injections of extracts of house dust and housedust mite in healthy dogs and dogs suspected of being atopic. *J Am Vet Med Assoc* 1995; 206: 812-6.

Cosgrove SB, Wren JA, Cleaver DM, Walsh KF, Follis SI, King VI, Tena JK, Stegemann MR. A blinded, randomized, placebo-controlled trial of the efficacy and safety of the Janus kinase inhibitor oclacitinib (Apoquel®) in client-owned dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2013; 24: 587-97, e141-2.

DeBoer DJ. Survey of intradermal skin testing practices in North America. *J Am Vet Med Assoc* 1989; 195: 1357-63.

DeBoer DJ, Hillier A. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XV): fundamental concepts in clinical diagnosis. *Vet Immunol Immunopathol* 2001a; 81: 271-6.

DeBoer DJ, Hillier A. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XVI): laboratory evaluation of dogs with atopic dermatitis with serum-based “allergy” tests. *Vet Immunol Immunopathol* 2001b; 81: 277-87.

DeBoer DJ, Griffin CE. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XXI): antihistamine pharmacotherapy. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 81: 323-9.

DeBoer DJ, Marsella R. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XII): the relationship of cutaneous infections to the pathogenesis and clinical course of canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 81: 239-49.

DeBoer DJ, Verbrugge M, Morris M. Clinical and immunological responses of dust mite sensitive, atopic dogs to treatment with sublingual immunotherapy (SLIT). *Vet Dermatol* 2016; 27: 82-7e23.

Deinhofer K, Sevcik H, Balic N, Harwanegg C, Hiller R, Rumpold H, Mueller MW, Spitzauer S. Microarrayed allergens for IgE profiling. *Methods* 2004; 32: 249-54.

Dérier, Morrison S, De W, Dérier M. Monoclonal anti-IgE antibodies in the diagnosis of dog allergy. *Vet Dermatol* 1998; 9: 185-90.

Ebner C, Siemann U, Bohle B, Willheim M, Wiedermann U, Schenk S, Klotz F, Ebner H, Kraft D, Scheiner O. Immunological changes during specific immunotherapy of grass pollen allergy: reduced lymphoproliferative responses to allergen and shift from TH2 to TH1 in T-cell clones specific for Phl p 1, a major grass pollen allergen. *Clin Exp Allergy* 1997; 27: 1007-15.

Eichenseer M, Johansen C, Mueller RS. Efficacy of dimetinden and hydroxyzine/chlorpheniramine in atopic dogs: a randomised, controlled, double-blinded trial. *Vet Rec* 2013; 173: 423.

Elias PM, Hatano Y, Williams ML. Basis for the barrier abnormality in atopic dermatitis: outside-inside-outside pathogenic mechanisms. *J Allergy Clin Immunol*

2008; 121: 1337-43.

Eyerich K, Novak N. Immunology of atopic eczema: overcoming the Th1/Th2 paradigm. *Allergy* 2013; 68: 974-82.

Farmaki R, Saridomichelakis MN, Leontides L, Papazahariadou MG, Gioulekas D, Koutinas AF. Dust mite species in the households of mite-sensitive dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2012; 23: 222-e45.

Favrot C, Steffan J, Seewald W, Picco F. A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. *Vet Dermatol* 2010; 21: 23-31.

Fischer N, Rostaher A, Favrot C. [Intralymphatic immunotherapy: An effective and safe alternative route for canine atopic dermatitis]. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2016; 158: 646-52.

Forsythe P, Paterson S. Ciclosporin 10 years on: indications and efficacy. *Vet Rec* 2014; 174 Suppl 2: 13-21.

Foster AP, Jackson HA, Stedman K, Knowles TG, Day MJ, Shaw SE. Serological responses to house dust mite antigens in atopic dogs while receiving allergen-specific immunotherapy. *Vet Dermatol* 2002; 13: 211-29.

Foster AP, Littlewood JD, Webb P, Wood JLN, Rogers K, Shaw SE. Comparison of intradermal and serum testing for allergen-specific IgE using a FcεRIα-based assay in atopic dogs in the UK. *Vet Immunol Immunopathol* 2003; 93: 51-60.

Fujimura M, Masuda K, Hayashiya M, Okayama T. Flow cytometric analysis of lymphocyte proliferative responses to food allergens in dogs with food allergy. *J Vet Med Sci* 2011; 73: 1309-17.

Gadeyne C, Little P, King VL, Edwards N, Davis K, Stegemann MR. Efficacy of

ocloclitinib (Apoquel®) compared with prednisolone for the control of pruritus and clinical signs associated with allergic dermatitis in client-owned dogs in Australia. *Vet Dermatol* 2014; 25: 512-8, e86.

Gallai V, Sarchielli P, Trequattrini A, Franceschini M, Floridi A, Firenze C, Alberti A, Di Benedetto D, Stragliotto E. Cytokine secretion and eicosanoid production in the peripheral blood mononuclear cells of MS patients undergoing dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Neuroimmunol* 1995; 56: 143-53.

Goldman C, Rosser E, Jr., Petersen A, Hauptman J. Investigation on the effects of ciclosporin (Atopica) on intradermal test reactivity and allergen-specific immunoglobulin (IgE) serology in atopic dogs. *Vet Dermatol* 2010; 21: 393-9.

Gonzales AJ, Bowman JW, Fici GJ, Zhang M, Mann DW, Mitton-Fry M. Oclacitinib (APOQUEL®) is a novel Janus kinase inhibitor with activity against cytokines involved in allergy. *J Vet Pharmacol Ther* 2014; 37: 317-24.

Griffin CE, Hillier A. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XXIV): allergen-specific immunotherapy. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 81: 363-83.

Griffin CE, DeBoer DJ. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIV): clinical manifestations of canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 81: 255-69.

Grohmann U, Orabona C, Fallarino F, Vacca C, Calcinaro F, Falorni A, Candeloro P, Belladonna ML, Bianchi R, Fioretti MC, Puccetti P. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol* 2002; 3: 1097-101.

Gupta S, Manubhai KP, Kulkarni V, Srivastava S. An overview of innovations and industrial solutions in Protein Microarray Technology. *Proteomics* 2016; 16: 1297-308.

Halliwell R. Revised nomenclature for veterinary allergy. *Vet Immunol Immunopathol* 2006; 114: 207-8.

Hämmerling R, De Weck A. Comparison of two diagnostic tests for canine atopy using monoclonal anti-IgE antibodies. *Vet Dermatol* 1998; 9: 191-200.

Harskamp CT, Armstrong AW. Immunology of atopic dermatitis: novel insights into mechanisms and immunomodulatory therapies. *Semin Cutan Med Surg* 2013; 32: 132-9.

Harwanegg C, Laffer S, Hiller R, Mueller MW, Kraft D, Spitzauer S, Valenta R. Microarrayed recombinant allergens for diagnosis of allergy. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 7-13.

Harwanegg C, Hiller R. Protein microarrays in diagnosing IgE-mediated diseases: spotting allergy at the molecular level. *Expert Rev Mol Diagn* 2004; 4: 539-48.

Harwanegg C, Hiller R. Protein microarrays for the diagnosis of allergic diseases: state-of-the-art and future development. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43: 1321-6.

Hendricks A, Schuberth HJ, Schueler K, Lloyd DH. Frequency of superantigen-producing *Staphylococcus intermedius* isolates from canine pyoderma and proliferation-inducing potential of superantigens in dogs. *Res Vet Sci* 2002; 73: 273-7.

Henneveld K, Beck W, Müller R. Evaluierung von Vorratsmilben in kommerziellem Hundetrockenfutter und in der Umgebung sowie ihre Bedeutung in der Tiermedizin. *Tierarztl Prax Ausg K* 2007; 35: 325-32.

Hensel P, Austel M, Medleau L, Zhao Y, Vidyashankar A. Determination of threshold concentrations of allergens and evaluation of two different histamine concentrations in canine intradermal testing. *Vet Dermatol* 2004; 15: 304-8.

Hensel P, Santoro D, Favrot C, Hill P, Griffin C. Canine atopic dermatitis: detailed guidelines for diagnosis and allergen identification. *BMC Vet Res* 2015; 11: 196.

Hickey GJ, Chang CH, Marsilion F, Trimboli W, Rickes EL. Effects of Prednisone on Dermal Responses in Flea-Allergen Hypersensitized Dogs. *Vet Dermatol* 1993; 4: 71-7.

Hill PB, Moriello KA, DeBoer DJ. Concentrations of total serum IgE, IgA, and IgG in atopic and parasitized dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 1995; 44: 105-13.

Hill PB, DeBoer DJ. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (IV): environmental allergens. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 81: 169-86.

Hiller R, Laffer S, Harwanegg C, Huber M, Schmidt WM, Twardosz A, Barletta B, Becker WM, Blaser K, Breiteneder H, Chapman M, Cramer R, Duchene M, Ferreira F, Fiebig H, Hoffmann-Sommergruber K, King TP, Kleber-Janke T, Kurup VP, Lehrer SB, Lidholm J, Muller U, Pini C, Reese G, Scheiner O, Scheynius A, Shen HD, Spitzauer S, Suck R, Swoboda I, Thomas W, Tinghino R, Van Hage-Hamsten M, Virtanen T, Kraft D, Muller MW, Valenta R. Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment. *FASEB J* 2002; 16: 414-6.

Hillier A, Griffin CE. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (X): is there a relationship between canine atopic dermatitis and cutaneous adverse food reactions? *Vet Immunol Immunopathol* 2001a; 81: 227-31.

Hillier A, Griffin CE. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (I): incidence and prevalence. *Vet Immunol Immunopathol* 2001b; 81: 147-51.

Hillier A, DeBoer DJ. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XVII): intradermal testing. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 81: 289-304.

Hillier A, Lloyd DH, Weese JS, Blondeau JM, Boothe D, Breitschwerdt E, Guardabassi L, Papich MG, Rankin S, Turnidge JD, Sykes JE. Guidelines for the

diagnosis and antimicrobial therapy of canine superficial bacterial folliculitis (Antimicrobial Guidelines Working Group of the International Society for Companion Animal Infectious Diseases). *Vet Dermatol* 2014; 25: 163-e43.

Hobi S, Mueller RS. Efficacy and safety of rush immunotherapy with alum-precipitated allergens in canine atopic dermatitis. *Tierarztl Prax Ausg K* 2014; 42: 167-73.

Honda T, Miyachi Y, Kabashima K. Regulatory T cells in cutaneous immune responses. *J Dermatol Sci* 2011; 63: 75-82.

Hubbard TL, White PD. Comparison of Subjective and Objective Intradermal Allergy Test Scoring Methods in Dogs with Atopic Dermatitis. *J Am Anim Hosp Assoc* 2011; 47: 399-405.

Imokawa G, Abe A, Jin K, Higaki Y, Kawashima M, Hidano A. Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin? *J Invest Dermatol* 1991; 96: 523-6.

Ishida R, Masuda K, Kurata K, Ohno K, Tsujimoto H. Lymphocyte blastogenic responses to inciting food allergens in dogs with food hypersensitivity. *J Vet Intern Med* 2004; 18: 25-30.

Ito Y, Adachi Y, Makino T, Higashiyama H, Fuchizawa T, Shimizu T, Miyawaki T. Expansion of FOXP3-positive CD4+CD25+ T cells associated with disease activity in atopic dermatitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2009; 103: 160-5.

Jaeger K, Linek M, Power H, Bettenay S, Zabel S, Rosychuk R, Mueller RS. Breed and site predispositions of dogs with atopic dermatitis: a comparison of five locations in three continents. *Vet Dermatol* 2010; 21: 119-23.

Jahn-Schmid B, Harwanegg C, Hiller R, Bohle B, Ebner C, Scheiner O, Mueller MW. Allergen microarray: comparison of microarray using recombinant allergens

with conventional diagnostic methods to detect allergen-specific serum immunoglobulin E. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 1443-9.

Johansson SG, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF, Motala C, Ortega Martell JA, Platts-Mills TA, Ring J, Thien F, Van Cauwenberge P, Williams HC. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 832-6.

Jurakić Tončić R, Marinović B. The Role of Impaired Epidermal Barrier Function in Atopic Dermatitis. *Acta Dermatovenerol Croat* 2016; 24: 95-109.

Jutel M, Akdis M, Budak F, Aebischer-Casaulta C, Wrzyszc M, Blaser K, Akdis CA. IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur J Immunol* 2003; 33: 1205-14.

Kawano K, Oumi K, Ashida Y, Horiuchi Y, Mizuno T. The prevalence of dogs with lymphocyte proliferative responses to food allergens in canine allergic dermatitis. *Pol J Vet Sci* 2013; 16: 735-9.

Kennis RA. Food Allergies: Update of Pathogenesis, Diagnoses, and Management. *Vet Clin North Am Small* 2006; 36: 175-84.

Keppel KE, Campbell KL, Zuckermann FA, Greeley EA, Schaeffer DJ, Husmann RJ. Quantitation of canine regulatory T cell populations, serum interleukin-10 and allergen-specific IgE concentrations in healthy control dogs and canine atopic dermatitis patients receiving allergen-specific immunotherapy. *Vet Immunol Immunopathol* 2008; 123: 337-44.

Kim TE, Park SW, Cho NY, Choi SY, Yong TS, Nahm BH, Lee S, Noh G. Quantitative measurement of serum allergen-specific IgE on protein chip. *Exp Mol Med* 2002; 34: 152-8.

Kita K, Sueyoshi N, Okino N, Inagaki M, Ishida H, Kiso M, Imayama S, Nakamura T, Ito M. Activation of bacterial ceramidase by anionic glycerophospholipids: possible involvement in ceramide hydrolysis on atopic skin by *Pseudomonas* ceramidase. *Biochem J* 2002; 362: 619-26.

Klukowska-Rotzler J, Chervet L, Muller EJ, Roosje P, Marti E, Janda J. Expression of thymic stromal lymphopoietin in canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2013; 24: 54-9.e13-4.

Kuo IH, Yoshida T, De Benedetto A, Beck LA. The cutaneous innate immune response in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 131: 266-78.

Larche M, Akdis CA, Valenta R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 761-71.

Lauber B, Molitor V, Meury S, Doherr MG, Favrot C, Tengvall K, Bergvall K, Leeb T, Roosje P, Marti E. Total IgE and allergen-specific IgE and IgG antibody levels in sera of atopic dermatitis affected and non-affected Labrador- and Golden retrievers. *Vet Immunol Immunopathol* 2012; 149: 112-8.

Leyden JJ, Marples RR, Kligman AM. *Staphylococcus aureus* in the lesions of atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 1974; 90: 525-30.

Lian TM, Halliwell REW. Allergen-specific IgE and IgGd antibodies in atopic and normal dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 1998; 66: 203-23.

Lin Y-T, Wang C-T, Chiang B-L. Role of Bacterial Pathogens in Atopic Dermatitis. *Clin Rev Allerg Immu* 2007; 33: 167-77.

Little PR, King VL, Davis KR, Cosgrove SB, Stegemann MR. A blinded, randomized clinical trial comparing the efficacy and safety of oclacitinib and ciclosporin for the control of atopic dermatitis in client-owned dogs. *Vet Dermatol*

2015; 26: 23-30, e7-8.

Loewenstein C, Mueller RS. A review of allergen-specific immunotherapy in human and veterinary medicine. *Vet Dermatol* 2009; 20: 84-98.

Loflath A, von Voigts-Rhetz A, Jaeger K, Schmid M, Kuechenhoff H, Mueller RS. The efficacy of a commercial shampoo and whirlpooling in the treatment of canine pruritus - a double-blinded, randomized, placebo-controlled study. *Vet Dermatol* 2007; 18: 427-31.

Loser K, Beissert S. Regulatory T cells: banned cells for decades. *J Invest Dermatol* 2012; 132: 864-71.

Lund EM, Armstrong PJ, Kirk CA, Kolar LM, Klausner JS. Health status and population characteristics of dogs and cats examined at private veterinary practices in the United States. *J Am Vet Med Assoc* 1999; 214: 1336-41.

Lupinek C, Wollmann E, Baar A, Banerjee S, Breiteneder H, Broecker BM, Bublin M, Curin M, Flicker S, Garmatiuk T, Hochwallner H, Mittermann I, Pahr S, Resch Y, Roux KH, Srinivasan B, Stentzel S, Vrtala S, Willison LN, Wickman M, Lødrup-Carlsen KC, Antó JM, Bousquet J, Bachert C, Ebner D, Schleder T, Harwanegg C, Valenta R. Advances in allergen-microarray technology for diagnosis and monitoring of allergy: The MeDALL allergen-chip. *Methods* 2014; 66: 106-19.

Mari A, Scala E, Alessandri C. The IgE-microarray testing in atopic dermatitis: a suitable modern tool for the immunological and clinical phenotyping of the disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2011; 11: 438-44.

Marsella R. Calcineurin inhibitors: a novel approach to canine atopic dermatitis. *J Am Anim Hosp Assoc* 2005; 41: 92-7.

Marsella R, Sousa CA, Gonzales AJ, Fadok VA. Current understanding of the

pathophysiologic mechanisms of canine atopic dermatitis. *J Am Vet Med Assoc* 2012; 241: 194-207.

Marti E, Wang X, Jambari NN, Rhyner C, Olzhausen J, Perez-Barea JJ, Figueredo GP, Alcocer MJ. Novel in vitro diagnosis of equine allergies using a protein array and mathematical modelling approach: a proof of concept using insect bite hypersensitivity. *Vet Immunol Immunopathol* 2015; 167: 171-7.

McEwan NA, Mellor D, Kalna G. Adherence by *Staphylococcus intermedius* to canine corneocytes: a preliminary study comparing noninflamed and inflamed atopic canine skin. *Vet Dermatol* 2006; 17: 151-4.

Moya R, Carnes J, Sinovas N, Ramio L, Brazis P, Puigdemont A. Immunoproteomic characterization of a *Dermatophagoides farinae* extract used in the treatment of canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* 2016; 180: 1-8.

Mueller RS, Burrows A, Tsohalis J. Comparison of intradermal testing and serum testing for allergen-specific IgE using monoclonal IgE antibodies in 84 atopic dogs. *Aust Vet J* 1999; 77: 290-4.

Mueller RS, Bettenay SV, Tideman L. Aero-allergens in canine atopic dermatitis in southeastern Australia based on 1000 intradermal skin tests. *Aust Vet J* 2000; 78: 392-9.

Mueller RS, Bettenay SV. Evaluation of the safety of an abbreviated course of injections of allergen extracts (rush immunotherapy) for the treatment of dogs with atopic dermatitis. *Am J Vet Res* 2001; 62: 307-10.

Mueller RS, Fieseler KV, Fettman MJ, Zabel S, Rosychuk RA, Ogilvie GK, Greenwalt TL. Effect of omega-3 fatty acids on canine atopic dermatitis. *J Small Anim Pract* 2004; 45: 293-7.

Mueller RS, Fieseler KV, Rosychuk RAW, Greenwalt T. Intradermal testing with the storage mite *Tyrophagus putrescentiae* in normal dogs and dogs with atopic dermatitis in Colorado. *Vet Dermatol* 2005; 16: 27-31.

Mueller RS, Bergvall K, Bensignor E, Bond R. A review of topical therapy for skin infections with bacteria and yeast. *Vet Dermatol* 2012; 23: 330-e62.

Mueller RS, Janda J, Jensen-Jarolim E, Rhyner C, Marti E. Allergens in veterinary medicine. *Allergy* 2016; 71: 27-35.

Müller MR, Linek M, Lowenstein C, Rothig A, Doucette K, Thorstensen K, Mueller RS. Evaluation of cyclosporine-sparing effects of polyunsaturated fatty acids in the treatment of canine atopic dermatitis. *Vet J* 2016; 210: 77-81.

Nødtvedt A, Egenvall A, Bergvall K, Hedhammar A. Incidence of and risk factors for atopic dermatitis in a Swedish population of insured dogs. *Vet Rec* 2006; 159: 241-6.

Nødtvedt A, Bergvall K, Sallander M, Egenvall A, Emanuelson U, Hedhammar Å. A case-control study of risk factors for canine atopic dermatitis among boxer, bullterrier and West Highland white terrier dogs in Sweden. *Vet Dermatol* 2007; 18: 309-15.

Novak N, Bieber T, Leung DYM. Immune mechanisms leading to atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112: S128-S39.

Nuttall T, Reece D, Roberts E. Life-long diseases need life-long treatment: long-term safety of ciclosporin in canine atopic dermatitis. *Vet Rec* 2014; 174 Suppl 2: 3-12.

Nuttall TJ, Lamb JR, Hill PB. Characterisation of major and minor *Dermatophagoides* allergens in canine atopic dermatitis. *Res Vet Sci* 2001; 71: 51-7.

Nutten S. Atopic Dermatitis: Global Epidemiology and Risk Factors. *Ann Nutr Metab* 2015; 66(suppl 1): 8-16.

Olivry T, Marsella R, Hillier A. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XXIII): are essential fatty acids effective? *Vet Immunol Immunopathol* 2001a; 81: 347-62.

Olivry T, Dunston S, Murphy K, Moore P. Characterization of the inflammatory infiltrate during IgE-mediated late phase reactions in the skin of normal and atopic dogs. *Vet Dermatol* 2001b; 12: 49-58.

Olivry T, Sousa CA. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XX): glucocorticoid pharmacotherapy. *Vet Immunol Immunopathol* 2001a; 81: 317-22.

Olivry T, Sousa CA. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIX): general principles of therapy. *Vet Immunol Immunopathol* 2001b; 81: 311-6.

Olivry T, Mueller RS, The International Task Force On Canine Atopic D. Evidence-based veterinary dermatology: a systematic review of the pharmacotherapy of canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2003; 14: 121-46.

Olivry T, DeBoer DJ, Prelaud P, Bensignor E, International Task Force on Canine Atopic D. Food for thought: pondering the relationship between canine atopic dermatitis and cutaneous adverse food reactions. *Vet Dermatol* 2007; 18: 390-1.

Olivry T, DeBoer DJ, Favrot C, Jackson HA, Mueller RS, Nuttall T, Prélaud P, for the International Task Force on Canine Atopic D. Treatment of canine atopic dermatitis: 2010 clinical practice guidelines from the International Task Force on Canine Atopic Dermatitis. *Vet Dermatol* 2010; 21: 233-48.

Olivry T, Saridomichelakis M. Evidence-based guidelines for anti-allergic drug withdrawal times before allergen-specific intradermal and IgE serological tests in dogs. *Vet Dermatol* 2013; 24: 225-e49.

Olivry T, DeBoer DJ, Favrot C, Jackson HA, Mueller RS, Nuttall T, Prélard P, for the International Committee on Allergic Diseases of A. Treatment of canine atopic dermatitis: 2015 updated guidelines from the International Committee on Allergic Diseases of Animals (ICADA). *BMC Vet Res* 2015; 11: 210.

Ott H, Baron J, Merk HF. [In vitro allergy testing]. *Hautarzt* 2006; 57: 502, 4-8.

Ou LS, Goleva E, Hall C, Leung DY. T regulatory cells in atopic dermatitis and subversion of their activity by superantigens. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 756-63.

Paludan SR. Interleukin-4 and interferon-gamma: the quintessence of a mutual antagonistic relationship. *Scand J Immunol* 1998; 48: 459-68.

Park S-J, Ohya F, Yamashita K, Nishifuji K, Iwasaki T. Comparison of Response to Immunotherapy by Intradermal Skin Test and Antigen-Specific IgE in Canine Atopy. *J Vet Med Sci* 2000; 62: 983-8.

Picco F, Zini E, Nett C, Naegeli C, Bigler B, Rufenacht S, Roosje P, Gutzwiller ME, Wilhelm S, Pfister J, Meng E, Favrot C. A prospective study on canine atopic dermatitis and food-induced allergic dermatitis in Switzerland. *Vet Dermatol* 2008; 19: 150-5.

Plant JD, Neradilek MB. Effectiveness of regionally-specific immunotherapy for the management of canine atopic dermatitis. *BMC Vet Res* 2017; 13: 4.

Popiel J, Cekiera A. Comparison of IgE test results with intradermal skin tests for dust mites and storage mites in atopic dogs. *Pol J Vet Sci* 2015; 18: 351-6.

Pucheu-Haston CM, Bizikova P, Marsella R, Santoro D, Nuttall T, Eisenschenk MNC. Review: Lymphocytes, cytokines, chemokines and the T-helper 1–T-helper 2 balance in canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2015; 26: 124-e32.

Rees CA. Canine and feline atopic dermatitis: A review of the diagnostic options. *Clin Tech Small Anim Pract* 2001; 16: 230-2.

Roguedas-Contios A-M, Misery L. What is Intrinsic Atopic Dermatitis? *Clin Rev Allerg Immu* 2011; 41: 233-6.

Roque JB, O'Leary CA, Kyaw-Tanner M, Latter M, Mason K, Shipstone M, Vogelnest L, Duffy D. High allergen-specific serum immunoglobulin E levels in nonatopic West Highland white terriers. *Vet Dermatol* 2011; 22: 257-66.

Sævik BK, Ulstein TL, Larsen HJS. Evaluation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of allergen-specific IgE antibodies in dogs. *Res Vet Sci* 2003; 74: 37-45.

Sævik BK, Bergvall K, Holm BR, Saijonmaa-Koulumies LE, Hedhammar A, Larsen S, Kristensen F. A randomized, controlled study to evaluate the steroid sparing effect of essential fatty acid supplementation in the treatment of canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2004; 15: 137-45.

Santoro D, Marsella R, Ahrens K, Graves TK, Bunick D. Altered mRNA and protein expression of filaggrin in the skin of a canine animal model for atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2013; 24: 329-36, e73.

Santoro D, Marsella R, Pucheu-Haston CM, Eisenschenk MN, Nuttall T, Bizikova P. Review: Pathogenesis of canine atopic dermatitis: skin barrier and host-micro-organism interaction. *Vet Dermatol* 2015; 26: 84-e25.

Santoro D, Rodrigues Hoffmann A. Canine and Human Atopic Dermatitis: Two Faces of the Same Host-Microbe Interaction. *J Invest Dermatol* 2016; 136: 1087-9.

Saridomichelakis MN, Koutinas AF, Gioulekas D, Leontidis L. Canine atopic dermatitis in Greece: clinical observations and the prevalence of positive intradermal test reactions in 91 spontaneous cases. *Vet Immunol Immunopathol*

1999; 69: 61-73.

Saridomichelakis MN, Olivry T. An update on the treatment of canine atopic dermatitis. *Vet J* 2016; 207: 29-37.

Schiessl B, Zemann B, Hodgkin-Pickart LA, de Weck AL, Griot-Wenk M, Mayer P, Nefzger M, Schneider H, Liehl E. Importance of early allergen contact for the development of a sustained immunoglobulin E response in a dog model. *Int Arch Allergy Immunol* 2003; 130: 125-34.

Schnabl B, Bettenay SV, Dow K, Mueller RS. Results of allergen-specific immunotherapy in 117 dogs with atopic dermatitis. *Vet Rec* 2006; 158: 81-5.

Shimada K, Yoon JS, Yoshihara T, Iwasaki T, Nishifuji K. Increased transepidermal water loss and decreased ceramide content in lesional and non-lesional skin of dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2009; 20: 541-6.

Shreffler WG. Microarrayed recombinant allergens for diagnostic testing. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127: 843-9.

Soumelis V, Reche PA, Kanzler H, Yuan W, Edward G, Homey B, Gilliet M, Ho S, Antonenko S, Lauerma A, Smith K, Gorman D, Zurawski S, Abrams J, Menon S, McClanahan T, Waal-Malefyt Rd, Bazan F, Kastelein RA, Liu Y-J. Human epithelial cells trigger dendritic cell-mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol* 2002; 3: 673-80.

Stedman K, Lee K, Hunter S, Rivoire B, McCall C, Wassom D. Measurement of canine IgE using the alpha chain of the human high affinity IgE receptor. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 78: 349-55.

Steffan J, Alexander D, Brovedani F, Fisch RD. Comparison of cyclosporine A with methylprednisolone for treatment of canine atopic dermatitis: a parallel, blinded, randomized controlled trial. *Vet Dermatol* 2003; 14: 11-22.

Steffan J, Parks C, Seewald W. Clinical trial evaluating the efficacy and safety of cyclosporine in dogs with atopic dermatitis. *J Am Vet Med Assoc* 2005; 226: 1855-63.

Sture GH, Halliwell RE, Thoday KL, van den Broek AH, Henfrey JI, Lloyd DH, Mason IS, Ferguson E. Canine atopic disease: the prevalence of positive intradermal skin tests at two sites in the north and south of Great Britain. *Vet Immunol Immunopathol* 1995; 44: 293-308.

Swinnen C, Vroom M. The clinical effect of environmental control of house dust mites in 60 house dust mite-sensitive dogs. *Vet Dermatol* 2004; 15: 31-6.

Szegedi A, Barath S, Nagy G, Szodoray P, Gal M, Sipka S, Bagdi E, Banham AH, Krenacs L. Regulatory T cells in atopic dermatitis: epidermal dendritic cell clusters may contribute to their local expansion. *Br J Dermatol* 2009; 160: 984-93.

Taszkun I. The results of intradermal skin tests (IDST) in dogs with atopic dermatitis from the Lublin voivodeship. *Pol J Vet Sci* 2011; 14: 95-101.

Temizel E, Cihan H, Akhtardanesh B, Aytug N. Effect of prednisolone and cetirizine on *D. farinae* and histamine-induced wheal and flare response in healthy dogs. *Tierarztl Prax Ausg K* 2011; 39: 25-30.

Templin MF, Stoll D, Schrenk M, Traub PC, Vöhringer CF, Joos TO. Protein microarray technology. *Drug Discov Today* 2002; 7: 815-22.

Thyssen JP, Kezic S. Causes of epidermal filaggrin reduction and their role in the pathogenesis of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 134: 792-9.

Turner KJ, Stewart GA, Sharp AH, Czarny D. Standardization of allergen extracts by inhibition of RAST, skin test, and chemical composition. *Clin Exp Allergy* 1980; 10: 441-50.

Van Ree R, Van Leeuwen WA, Dieges PH, Van Wijk RG, De Jong N, Brewczynski PZ, Kroon AM, Schilte PP, Tan KY, Simon-Licht IF, Roberts AM, Stapel SO, Aalberse RC. Measurement of IgE antibodies against purified grass pollen allergens (Lol p 1, 2, 3 and 5) during immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 1997; 27: 68-74.

Vaughan JW, McLaughlin TE, Perzanowski MS, Platts-Mills TA. Evaluation of materials used for bedding encasement: effect of pore size in blocking cat and dust mite allergen. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 227-31.

Verhagen J, Akdis M, Traidl-Hoffmann C, Schmid-Grendelmeier P, Hijnen D, Knol EF, Behrendt H, Blaser K, Akdis CA. Absence of T-regulatory cell expression and function in atopic dermatitis skin. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 176-83.

Warner A, Bostrom S, Moller C, Kjellman NI. Mite fauna in the home and sensitivity to house-dust and storage mites. *Allergy* 1999; 54: 681-90.

Wassom, Grieve, Wassom DL. In vitro measurement of canine and feline IgE: a review of FcεR1α-based assays for detection of allergen-reactive IgE. *Vet Dermatol* 1998; 9: 173-8.

Willemse A, van den Brom WE. Evaluation of the intradermal allergy test in normal dogs. *Res Vet Sci* 1982; 32: 57-61.

Willemse A, Van den Brom WE, Rijnberk A. Effect of hyposensitization on atopic dermatitis in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1984; 184: 1277-80.

Williams HC. Epidemiology of human atopic dermatitis - seven areas of notable progress and seven areas of notable ignorance. *Vet Dermatol* 2013; 24: 3-e2.

Williams P, Onell A, Baldracchini F, Hui V, Jolles S, El-Shanawany T. Evaluation of a novel automated allergy microarray platform compared with three other allergy test methods. *Clin Exp Immunol* 2016; 184: 1-10.

Wood SH, Ollier WE, Nuttall T, McEwan NA, Carter SD. Despite identifying some shared gene associations with human atopic dermatitis the use of multiple dog breeds from various locations limits detection of gene associations in canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* 2010; 138: 193-7.

Yamanaka K, Mizutani H. The role of cytokines/chemokines in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Curr Probl Dermatol* 2011; 41: 80-92.

Zunic M. Comparison between IMMUNODOT tests and the intradermal skin test in atopic dogs. *Vet Dermatol* 1998; 9: 201-6.

Zur G, White SD, Ihrke PJ, Kass PH, Toebe N. Canine atopic dermatitis: a retrospective study of 169 cases examined at the University of California, Davis, 1992-1998. Part II. Response to hyposensitization. *Vet Dermatol* 2002; 13: 103-11.

IX. ANHANG

1. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Differentialdiagnosen der caninen atopischen Dermatitis	20
Tabelle 2: Favrot Kriterien.....	21
Tabelle 3: Absetzzeitpunkt häufig verwendeter Medikamente vor Durchführung eines Intradermal- oder Serumallergietest.....	39
Tabelle 4: Konzentration verwendeter Allergen-Testlösungen	49
Tabelle 5: Im Intradermaltest verwendete Allergenextrakte.....	51
Tabelle 6: In die Statistik einbezogene Intradermaltest-Allergene und deren Gruppeneinteilung	56
Tabelle 7: Anzahl der in der Studie teilnehmenden Hunderassen	58
Tabelle 8: Prozentualer Anteil der Reaktion > 0 ausgewählter Allergene im Allergen-Microarray.....	59
Tabelle 9: Korrelationskoeffizient nach Kendall und Spearman von Intradermaltest und Allergen-Microarray	62
Tabelle 10: Prozentualer Anteil positiver Reaktionen im Intradermaltest.....	64

2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Allergen-Microarrays.....	41
Abbildung 2: Intradermaltest bei einem Hund	50
Abbildung 3: Microarray-Testplatte mit 16 Testfeldern	54
Abbildung 4: Microarray-Testplatte mit aufgesetztem ProPlate® Objektträgermodul.....	54
Abbildung 5: Mit einem Fluoreszenzlaser ausgelesene Microarray-Testplatte ..	54
Abbildung 6: Reaktionen der Allergene <i>D. farinae</i> , Spitzwegerich, <i>Aspergillus</i> und Buche im Intradermaltest und Allergen-Microarray	61

Abbildung 7: Reaktionen auf Milbenallergene im Intradermaltest und Allergen-Microarray	62
Abbildung 8: Reaktionen auf Milbenallergene im Allergen-Microarray in Abhängigkeit von der Klinik der Hunde	63
Abbildung 9: Reaktionen auf Milbenallergene im Intradermaltest	66
Abbildung 10: Reaktionen im Intradermaltest auf saisonale Allergene in Abhängigkeit vom Lebensraum der Hunde	67
Abbildung 11: Saisonalität des Juckreizes der Studienteilnehmer	67
Abbildung 12: Reaktionen im Intradermaltest gegen ganzjährige Allergene in Abhängigkeit von der Klinik der Hunde	69
Abbildung 13: Reaktionen im Intradermaltest gegen saisonale Allergene in Abhängigkeit von der Klinik der Hunde	69

3. Besitzerfragebogen

Besitzername		E-Mail:	Telefonnr.:
Adresse			
Tier Name	Alter		Rasse
	Jahre	Monate	
Geschlecht			
<input type="checkbox"/> weiblich <input type="checkbox"/> weiblich kastriert <input type="checkbox"/> männlich <input type="checkbox"/> männlich kastriert			
Im Besitz seit			

- Haben Sie ihr Tier von einem Züchter? ja nein _____

- Welches Futter bekommt ihr Tier? _____

- Bekannte Erkrankungen: _____

- Seit wann hat ihr Tier Hautprobleme? _____

- Welche Symptome zeigt ihr Tier?

Juckreiz Hautrötung Schuppen Krusten Pusteln Papeln

Haarausfall Tränenausfluss Schwarzfärbung der Haut

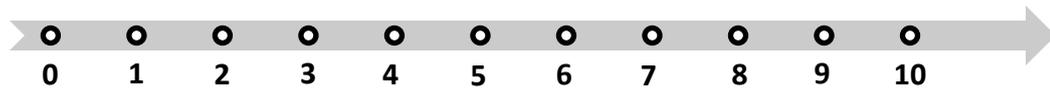
stumpfes Fell Fettige Haut

- Welche Körperregionen sind betroffen?

Kopf Ohren Hals/Brust Rücken Achseln Bauch

Leistengegend Flanken Schwanz(-ansatz) Pfoten

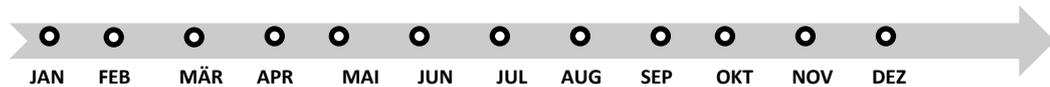
- Wie stark ist der Juckreiz? (siehe Skala am Ende)



kein JR

extremer JR

- In welchen Monaten treten die Symptome auf?



													Schwerer Juckreiz
													Mittlerer Juckreiz
													Leichter Juckreiz

ganzjährig

- Besteht bei ihrem Tier eine Futtermittelallergie?

ja nein

- Benötigt ihr Tier momentan Medikamente?

nein ja, welche: _____

- Wann hat ihr Tier zum letzten Mal folgende Medikamente bekommen?

Kortison: _____

Antihistaminika: _____

Apoquel: _____

Ohrmedikamente (Name angeben): _____

- Wurde bereits ein Allergietest durchgeführt?

nein

ja, welcher? → Serumallergietest Intrakutantest

Ergebnisse: _____

- Haben Sie bereits eine Desensibilisierung bei ihrem Hund gemacht?

nein ja, wann: _____

- Wo hält sich ihr Hund die meiste Zeit des Tages auf?

Haus/Wohnung Garten

- Was für Böden haben Sie in Ihrer Wohnung?

Parkett Fliesen Teppich Linoleum

- Haben Sie einen Luftbefeuchter?

Ja Nein

- Wann treten die Symptome der Allergie am stärksten auf?

draußen/auf der Gassirunde in der Wohnung/im Haus

- *In welcher Umgebung wohnen Sie?*

ländlich städtisch

- *Welche Baumarten befinden sich häufig in ihrer Umgebung oder auf der Gassirunde?*

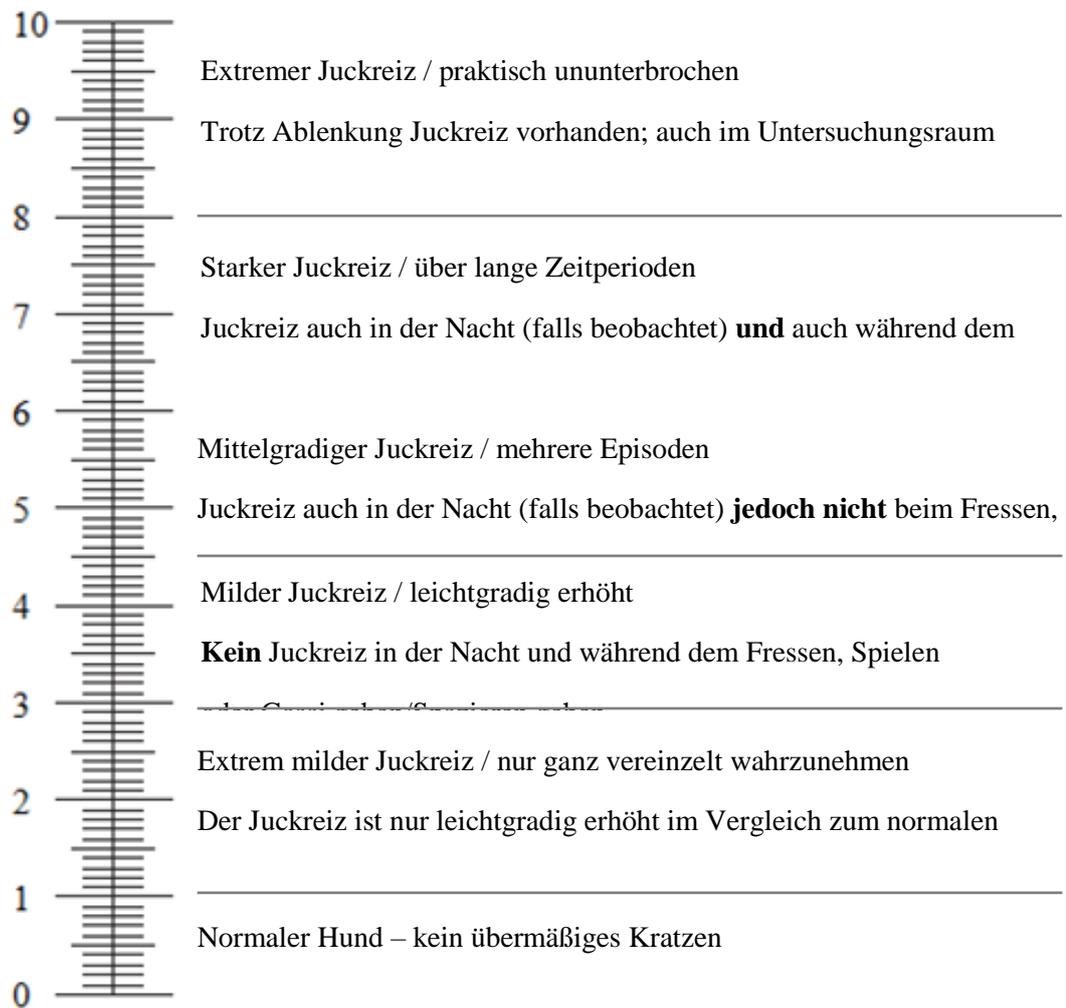
Birke Buche Eiche Pappel Lerche Ahorn Nussbaum

Linde Erle Weide

Ort, Datum

Besitzer

4. Juckreizskala



5. Allergentabelle Microarray

<i>Gruppe</i>	<i>Lateinische Bezeichnung</i>	<i>Deutsche Bezeichnung</i>
Arthropoden	Acarus siro	Mehlmilbe
	Aedes communis	Mosquito
	Anisakis pegreffii	Fadenwurm
	Anisakis simplex	Fadenwurm
	Apis mellifera	Biene
	Blatta orientalis	gem. Küchenschabe
	Blattella germanica	dt. Küchenschabe
	Blomia tropicalis	Vorratsmilbe
	Ctenocephalides felis	Katzenfloh
	Culex pipiens	gem. Stechmücke
	Culicoides nubeculosus	Stechmückenart
	Dermatophagoides farinae	Hausstaubmilbe
	Dermatophagoides pteronyssinus	Hausstaubmilbe
	Euroglyphus maynei	Hausstaubmilbe
	Helix aspersa	Weinbergschnecke
	Lepidoglyphus destructor	Heumilbe
	Periplaneta americana	amerik. Großschabe
Tyrophagus putrescentiae	Modermilbe	
Vespa crabro	Hornisse	
Vögel	Meleagris gallopavo	Truthuhn
Krustentiere	Homarus gammarus	Europ. Hummer
	Nephrops norvegicus	Kaiserhummer
	Pandalus borealis	Eismeergarnele
Milch	Bubalus bubalis	Wasserbüffel
	Camelus dromedarius	Dromedar
	Capra hircus	Wildziege
	Equus asinus	Afrikanischer Esel
	Homo sapiens	Mensch
	Vicugna pacos	Alpaka
Eier	Anas platyrhynchos	Stockenten-Ei
	Anser anser	Graugans-Ei
	Coturnix coturnix	Wachtel-Ei
	Gallus domesticus	Haushuhn-Ei
	Numida meleagris	Perlhuhn-Ei
	Pavo cristatus	Blauer Pfau-Ei
	Phasianus colchicus	Fasan-Ei
	Struthio camelus	Afrik. Strauß-Ei
	Struthio camelus	Afrik. Strauß-Ei

Epithel	<i>Bos domesticus</i> <i>Canis familiaris</i> <i>Cavia porcellus</i> <i>Cricetus cricetus</i> <i>Equus caballus</i> <i>Felis domesticus</i> <i>Mus musculus</i> <i>Oryctolagus cuniculus</i> <i>Ovis aries</i> <i>Rattus norvegicus</i>	Rind Hund Meerschwein Hamster Pferd Katze Maus Wildkaninchen Hausschaf Ratte
Fische	<i>Gadus callarias</i> <i>Lophius piscatorius</i> <i>Melanogrammus aeglefinus</i> <i>Merluccius capensis</i> <i>Merluccius hubbsi</i> <i>Merluccius merluccius</i> <i>Oncorhynchus mykiss</i> <i>Salmo salar</i> <i>Sardinops melanostictus</i> <i>Solea solea</i> <i>Thunnus albacares</i>	Dorsch Seeteufel Schellfisch Seehecht europ. Seehecht Hechtdorsch Regenbogenforelle Atlant. Lachs Sardine Seezunge Thunfisch
Früchte	<i>Actinidia chinensis</i> <i>Actinidia deliciosa</i> <i>Ananas comosus</i> <i>Capsicum annuum</i> <i>Carica papaya</i> <i>Citrus limon</i> <i>Citrus reticulata</i> <i>Citrus sinensis</i> <i>Cucumis melo</i> <i>Fragaria vesca</i> <i>Malus domestica</i> <i>Musa x paradisiaca</i> <i>Persea americana</i> <i>Prunus armeniaca</i> <i>Prunus persica</i> <i>Pyrus communis</i> <i>Solanum lycopersicum</i> <i>Vitis vinifera</i>	Kiwi Kiwi Ananas Paprika Papaya Zitrone Mandarine Orange Zuckermelone Wald-Erdbeere Apfel Banane Avocado Aprikose Pfirsich Birne Tomate Weintraube
Pilze	<i>Alternaria alternata</i> <i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Aspergillus restrictus</i>	Schimmelpilz Schimmelpilz Schimmelpilz

	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Candida albicans</i> <i>Cladosporium herbarum</i> <i>Drechslera halodes</i> <i>Malassezia pachydermatis</i> <i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Pleurotus ostreatus</i> <i>Rhizopus nigricans</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Schimmelpilz hefeähnlicher Pilz Hefepilz Schimmelpilz Schimmelpilz Hefepilz Pinselschimmelpilz Austern-Seitling Schimmelpilz Backhefe
Latex	<i>Hevea brasiliensis</i>	Kautschukbaum
Blätter	<i>Ocimum basilicum</i> <i>Petroselinum crispum</i> <i>Spinacia oleracea</i>	Basilikum Petersilie Spinat
Säuger	<i>Sus scrofa domestica</i>	Schwein
Weichtiere	<i>Loligo vulgaris</i> <i>Mytilus edulis</i> <i>Octopus vulgaris</i> <i>Ostrea edulis</i> <i>Penaeus monodon</i>	Kalmar Miesmuschel Oktopus europäische Auster Garnele
Motten	Moth Heterocera	Motte
Pollen	<i>Acer saccharinum</i> <i>Agrostis gigantea</i> <i>Alnus glutinosa</i> <i>Amaranthus cruentus</i> <i>Ambrosia artemisiifolia</i> <i>Ambrosia psilostachya</i> <i>Anthoxanthum odoratum</i> <i>Artemisia vulgaris</i> Ash allergo <i>Betula verrucosa</i> <i>Bromus inermis</i> <i>Chenopodium album</i> <i>Corylus avellana</i> <i>Cupressus arizonica</i> <i>Cynara scolymus</i> <i>Cynodon dactylon</i> <i>Dactylis glomerata</i> <i>Eucalyptus globulus</i> <i>Eupatorium capillifolium</i> <i>Fagopyrum esculentum</i> <i>Fagus grandifolia</i>	Silber-Ahorn Rießen-Straußgras Schwarze Erle Rispen-Fuchsschwanz Beifuß-Ambrosie Ambrosie Ruchgras Beifuß Esche Hängebirke wehrlose Trespe weißer Gänsefuß gem. Hasel Zypresse Artischocke Hundszahngras Knäuelgras Eukalyptus Wasserdorst Buchweizen amerik. Buche

	<i>Festuca pratensis</i> <i>Holcus lanatus</i> <i>Hordeum vulgare</i> <i>Humulus lupulus</i> <i>Juniperus virginiana</i> <i>Leucanthemum vulgare</i> <i>Linum usitatissimum</i> <i>Lolium perenne</i> <i>Mercurialis annua</i> <i>Olea europaea</i> <i>Parietaria judaica</i> <i>Parietaria officinalis</i> <i>Phleum pratense</i> <i>Phoenix dactylifera</i> <i>Plantago lanceolata</i> <i>Platanus acerifolia</i> <i>Poa pratensis</i> <i>Populus nigra</i> <i>Quercus robur</i> <i>Ricinus communis</i> <i>Rumex acetosella</i> <i>Rumex crispus</i> <i>Salix lasiolepis</i> <i>Salsola kali</i> <i>Secale cereale</i> <i>Sorghum halepense</i> <i>Taraxacum officinale</i> <i>Triticum aestivum</i> <i>Ulmus americana</i> <i>Urtica dioica</i> <i>Zea mays</i>	Wiesenschwingel wolliges Honiggras Gerste Hopfen Wacholder Margerite gem. Lein dt. Weidelgras Bingelkraut Olivenbaum Glaskraut aufrechtes Glaskraut Wiesen-Lieschgras Dattelpalme Spitzwegerich Ahornbl. Platane Wiesen-Rispengras Schwarzpappel Stieleiche Wunderbaum kl. Sauerampfer krauser Ampfer Weide Kali-Salzkraut Roggen Mohrenhirse Löwenzahn Weichweizen amerik. Ulme große Brennessel Mais
Samen	<i>Anacardium occidentale</i> <i>Arachis hypogaea</i> <i>Avena sativa</i> <i>Bertholletia excelsa</i> <i>Carya illinoensis</i> <i>Castanea sativa</i> <i>Ceratonia siliqua</i> <i>Cocos nucifera</i> <i>Corylus European</i> <i>Glycine max</i> <i>Helianthus annuus</i>	Cashew Erdnuss Hafer Paranussbaum Pekannuss Edelkastanie Johannisbrotbaum Kokospalme Hasel Sojabohne Sonnenblume

	<i>Lens culinaris</i> <i>Lupinus albus</i> <i>Oryza sativa</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Pinus pinea</i> <i>Pistacia vera</i> <i>Pisum sativum</i> <i>Prunus dulcis</i> <i>Sesamum indicum</i> <i>Sinapis alba</i> <i>Vicia faba</i>	Linse Weiße Lupine Reis Gartenbohne Pinie Pistazie Erbse Mandelbaum Sesam Weißer Senf Ackerbohne
Knollen	<i>Allium cepa</i> <i>Allium porrum</i> <i>Allium sativum</i> <i>Apium graveolens</i> <i>Armoracia rusticana</i> <i>Asparagus officinalis</i> <i>Beta vulgaris</i> <i>Cyperus esculentus</i> <i>Daucus carota</i> <i>Foeniculum vulgare</i>	Küchenzwiebel Lauch Knoblauch echter Sellerie Meerrettich Spargel Rübe Erdmandel Möhre Fenchel

6. Verwendete Materialien und Geräte

6.1. Zentrifugation des Serums

<i>Verwendete Materialien/Geräte</i>	<i>Hersteller</i>
Zentrifuge Universal 320 R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttling, Deutschland

6.2. Intradermaltest

<i>Verwendete Materialien/Geräte</i>	<i>Hersteller</i>
Artuветrin [®] Skin Test Allergenextrakte	Artu Biologicals Europe B.V., Lelystad, Niederlande
Atipam [®] 5 mg/ml	Eurovet Animal Health B.V., Bladel, Niederlande
Histamin	Artu Biologicals Europe B.V., Lelystad, Niederlande
Insulinspritze Omnican [®] 20	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Sedator [®] 1mg/ml	Eurovet Animal Health B.V., Bladel, Niederlande

6.3. Microarray

<i>Verwendete Materialien/Geräte</i>	<i>Hersteller</i>
BioTek ELx50 Plate Washer	BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA
Corning [®] 5 Objektträgerbehälter (Produkt # 40082)	Corning Incorporated, Corning, New York, USA

FAST Objektträger für Microarrays	Whatman Schleicher & Schuell, Dassal, Deutschland
GenePix 4000B	Molecular Devices, Sunnyvale, Kalifornien, USA
GenePix Pro Software v6.0.1.27	Molecular Devices, Sunnyvale, Kalifornien, USA
Maus Anti-Hund IgE (LS-C57551, Biotin)	LSBio LifeSpan Biosciences, Inc., Seattle, Washington, USA
MilliQ-Wasser und MilliQ®-Filteranlage	Merck Millipore KGaA, Billerica, Massachusetts, USA
MSE Mistral 3000i	MSE, London, Vereintes Königreich
Parafilm®	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, Illinois, USA
ProPlate® Objektträgermodul	Grace Bio-Labs, Bend, Oregon, USA
ProPlate® Slide Module Seal Strip	Grace Bio-Labs, Bend, USA
Streptavidin Cy5® (PA45001)	GE Healthcare, Little Chalfont, Vereintes Königreich
ThermoHybaid HyPro20	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Tween® 20	Croda International Plc., Snaith, Vereinigtes Königreich

6.4. Statistische Auswertung

<i>Verwendete Materialien/Geräte</i>	<i>Hersteller</i>
Software RStudio Version 3.3.1	RStudio, Inc.; Boston, Massachusetts, USA

Software GraphPad Prism[®] 6

GraphPad Software Inc., San Diego,
USA

X. DANKSAGUNG

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Professor Dr. Ralf Müller von ganzem Herzen bedanken, für die beste Betreuung die man sich nur wünschen kann. Mit seiner großen Begeisterung hat er mein Interesse an der Dermatologie geweckt und die Zeit in der ich von ihm lernen durfte ist für mich unbezahlbar. Seine stets uneingeschränkte Unterstützung und Motivation haben die Arbeit an dieser Dissertation zu einem großartigen Abschnitt meines Lebens gemacht. Ich bin sehr dankbar für die Zeit in der Dermatologie, die mich nicht nur fachlich, sondern auch persönlich stark wachsen hat lassen.

Vielen Dank auch an Professor Dr. Katrin Hartmann, für die Möglichkeit meine Doktorarbeit an der Medizinischen Kleintierklinik anfertigen zu dürfen.

Ein großes Dankeschön gebührt Professor Marcos Alcocer und seinem Team der Universität Nottingham, für die Durchführung des Protein-Microarrays und die tolle und lehrreiche Betreuung während meines Besuches.

Herzlichen Dank auch an Dr. Sonya Bettenay für das Sammeln von Studienpatienten und die freundliche Zusammenarbeit.

Bedanken möchte ich mich auch ganz herzlich bei Noemi Castelletti und André Klima des Institutes für Statistik der LMU München, für die tolle Unterstützung und ohne deren unermüdliche Hilfe die Statistik für mich ein Buch mit sieben Siegeln geblieben wäre.

Natürlich möchte ich auch allen Hunden und Besitzer in meiner Studie danken, ohne deren Mitwirken das alles nicht möglich gewesen wäre.

Vielen Dank an alle Mitarbeiter der Medizinischen Kleintierklinik. Die Arbeit mit euch war einfach toll und immer sehr lehrreich. Ganz besonders danke ich aber dem Team der Dermatologie, allen voran den Residents Christoph Klinger und Janine Claßen, für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die Durchführung der Intradermaltests. Ein großes Dankeschön geht an meine Mitdoktoranden Iris Wagner-Storz, Berrett Dengler, Theresa Raizner, Tanja Pfeiffer, Veronika Bayerl, Mai-Rose Müller und Maritta von Silva-Tarouca - nicht nur für die tolle Zusammenarbeit, sondern auch für die unvergessliche Zeit neben der Arbeit.

Großer Dank auch an meine Mädels Claudia, Anna, Carola, Andrea, Agnes, Lea und Elli, für euren stetigen Zuspruch und Unterstützung.

Ein riesiges Dankeschön geht an Uli, ohne die in meiner Doktorarbeit nicht nur das ein oder andere Komma zu viel gewesen wäre.

Von Herzen danken möchte ich Iris und Robert, für die unermüdliche Hilfe und Unterstützung zu jeder Tages- und Nachtzeit bei allen meinen Problemen. Ihr seid unglaublich. #NotYourProblem

Danken möchte ich auch Lotta, die stets für die nötige Ablenkung, aber auch Aufmunterung, gesorgt hat.

Der größte Dank geht jedoch an Mama, Papa und Mathias. Dafür, dass ihr immer hinter mir steht und mir dies alles ermöglicht habt. Ohne euch wäre ich nicht der Mensch der ich heute bin. Ich liebe euch!