

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

Die Behandlung des equinen Sommerekzems mit rekombinanten
Allergenen

von Anneli Graner
aus Heilbronn am Neckar

München 2025

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

Lehrstuhl für Innere Medizin der Kleintiere

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Ralf S. Mueller

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Ralf S. Mueller

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Anna May

Tag der Promotion: 08.Februar 2025

Für meine Eltern und meine Paten

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG	1
II. LITERATURÜBERSICHT	3
1. Das equine Sommerekzem	3
1.1. Defintion.....	3
1.2. Culicoides.....	3
1.3. Prävalenz	4
1.4. Immunpathogenese.....	5
1.5. Auslösende Allergene	7
2. Symptome	8
3. Diagnoseverfahren	9
3.1. <i>In-Vivo</i> Testverfahren.....	9
3.2. <i>In-Vitro</i> Testverfahren.....	9
4. Therapie	11
4.1. Insol Dermatophyton (ID).....	11
4.2. Fettsäuren	12
4.3. Glukokortikosteroide.....	12
4.4. Antihistaminika	13
4.5. Eigenbluttherapie	13
4.6. Aktive Immunisierung gegen Zytokine.....	13
4.7. Allergen (-spezifische) Immunotherapie (AIT)	14
III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	16
1. Zielsetzung	16
2. Publikation.....	16
IV. ERWEITERTE DISKUSSION.....	27
V. ZUSAMMENFASSUNG	37
VI. SUMMARY	38
VII. LITERATURVERZEICHNIS.....	39
VIII. DANKSAGUNG.....	47

Abkürzungsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

C.	Culicoides
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kg	Kilogramm
mg	Miligramm
ml	Mililiter
mm	Milimeter
Th	T-Helferzellen
z.B.	Zum Beispiel

I. EINLEITUNG

Das equine Sommerekzem („Equine insect bite hypersensitivity“ = IBH, *Culicoides* Hypersensitivität, „Queensland itch“ oder „Sweet itch“) ist die häufigste allergische entzündliche Hautkrankheit des Pferdes. Ausgelöst wird diese durch den Speichel blutsaugender Insekten, vor allem der Gattung *Culicoides* (Fadok & Greiner, 1990; Hellberg et al., 2006; Wilson et al., 2001).

Die Erkrankung kommt weltweit vor mit Ausnahmen von Ländern, in denen die Insekten nicht endemisch sind, wie z.B in Neuseeland und Island (Eckert, 2008; Illies et al., 1978).

Pferde, die an der Hypersensitivität leiden, zeigen Juckreiz und entzündliche Veränderungen der Haut, vor allem an den von den Mücken bevorzugten Stellen.

Die betroffenen Stellen sind hier vor allem die Mähne und der Schweif, jedoch können auch die Bauchnaht, der Kopf sowie die Ohren betroffen sein. Durch das vom Juckreiz ausgelöste Scheuern oder Beißen, kommt es zu weiteren entzündlichen Hautstellen und die schützende Hautbarriere wird zerstört (Lange, 2004)

Für die Besitzer kann die Betreuung und Pflege eines erkrankten Pferdes sehr zeitintensiv und aufwändig werden. Da die Behandlung im Moment vor allem darauf basiert, die Pferde vor den Mücken zu schützen, werden diese oft mit speziellen Decken eingedeckt. Zudem werden die Hautstellen häufig mit den juckreizlindernden Lotionen behandelt. Dies bedeutet nicht nur einen finanziellen, sondern auch einen zeitlichen Mehraufwand. Auch wirtschaftlich hat die Erkrankung Auswirkungen (Gehlen et al., 2014).

Betroffene Pferde können in ihrer Nutzung eingeschränkt sein. Scheuerstellen am Kopf können das Tragen einer Trense erschweren, an der Bauchnaht kann es die Auflagefläche des Sattelgurts maßgeblich beeinflussen. Bei Stuten, die in der Zucht eingesetzt werden, können entzündete Hautstellen am Euter das Säugen des Fohlens beeinträchtigen und häufig können die Pferde nicht den ganzen Sommer auf der Koppel bleiben, wenn die Mückenpopulation zu stark ist.

Die Behandlung des Sommerkzems stellt auch in der Praxis eine Herausforderung für den Tierarzt dar. Pferde, die unter den Symptomen der Hypersensibilität leiden, kann oft nur mit einer symptomatischen Therapie geholfen werden. In schweren Fällen werden hier auch Glukokortikoide eingesetzt (Kleider & Lees, 1984).

Verschiedene Behandlungsversuche mit Fettsäuren, unspezifischer Stimulation des Immunsystems oder Antihistaminika zeigten in Studien keine zufriedenstellenden Ergebnisse (Brunner, 2016; Huhmann, 2019; Olsén et al., 2008).

Ein neuer Ansatz ist die aktive Immunisierung gegen Zytokine. Hier werden Antikörper gegen spezifische Interleukine, in diesem Fall IL-5 und IL-31, nach Immunisierung mit den jeweiligen Interleukinen mit Hilfe eines virusähnlichen Partikels, vom Körper gebildet. Dadurch soll die Migration und Aktivierung eosinophiler Granulozyten und die darauffolgende Entzündung verringert werden beziehungsweise der Juckreiz gemildert werden. Die Ergebnisse der durchgeführten Studien sind vielversprechend (Fettelschoss-Gabriel et al., 2019; Fettelschoss-Gabriel et al., 2018; Jonsdottir et al., 2020; Olomski et al., 2020). Aber auch bei dieser aktiven Immunisierung gegen Interleukine handelt es sich nicht um einen kausale Therapieansatz der IBH. Hier kommt nur die Allergen Immuntherapie in Frage, um Allergien, die durch IgE vermittelt werden, erfolgreich zu behandeln. Hierfür werden kleinere Mengen des Allergens in bestimmten Zeitabständen an die betroffenen Tiere verabreicht, um eine Toleranz des Immunsystems gegen diese Allergene zu erreichen (Mueller et al., 2018).

Im Falle der IBH wurden bereits Studien mit Ganzkörperextrakten der *Culicoides* durchgeführt, die Ergebnisse hierzu waren jedoch sehr unterschiedlich (Anderson et al., 1996; Barbet et al., 1990; Ginel et al., 2014).

Durch die Identifizierung von Hauptallergenen, die an der Entstehung von IBH beteiligt sind, bietet sich nun die Möglichkeit, die AIT mit rekombinanten Allergenen durchzuführen (Novotny et al., 2021). Das Ziel dieser Doppelblindstudie war, zu untersuchen, ob eine Behandlung mit neun rekombinanten Allergenen bei an IBH erkrankten Pferden in Deutschland eine Besserung des Hautbildes und des Juckreizes erzielen kann.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Das equine Sommereczem

1.1. Definition

Das equine Sommereczem des Pferdes ist eine Typ-1 Allergie gegenüber dem Speichel weiblicher blutsaugender Insekten. Diese Mücken gehören zur Gattung der *Culicoides*, eine nahezu weltweit vorkommende Insektenart. Die Symptome der Erkrankung sind unterschiedlich ausgeprägt und saisonal auftretend, abhängig von der saisonalen Aktivität der Gnitzen kommt es zu unterschiedlich starkem Juckreiz (Fadok & Greiner, 1990).

1.2. Culicoides

Der wichtigste Auslöser der IBH sind *Culicoides* spp. die zu der Familie der Gnitzen (Ceratopogonidae), Ordnung der Zweiflügler (Diptera) und Unterordnung der Mücken (Nematocera) gehören. Die Gnitzen sind mit einer Länge von 1- 4 mm sehr klein. Ihre Antennen bestehen aus 12-15 Gliedern, die bei männlichen Vertretern büschelartig mit Haaren besetzt sind. Ihr Thorax ist wie ein Buckel aufgewölbt und die Flügel sind behaart und weisen hell- dunkle Flecken auf. Nur die weiblichen Tiere saugen Blut und benötigen dies nach der Begattung zur Eireifung. Die Eiablage erfolgt bevorzugt in feuchten und schlammigen Plätzen. In Deutschland ist vor allem *Culicoides (C.) obsoletus* verbreitet, deren Hauptwirt Pferde und Rinder sind (Ayllón et al., 2014; Eckert, 2008).

Im Speichel befinden sich zahlreiche Proteine, die nicht nur als Allergene fungieren, sondern die auch für die Blutmahlzeit der weiblichen Gnitzen wichtig sind, wie Proteasen und Proteine, die die Blutgerinnung hemmen. Über die Bisse können auch Krankheiten wie die Blauzungkrankheit bei Schafen und Rinder übertragen werden (Russell et al., 2009).

In warmen Regionen mit Lehmböden und vielen Bäumen ist die Prävalenz für IBH deutlich höher als in Küstennähe oder Regionen mit gesteigertem Niederschlag und

vielen kalten Tagen (Van Grevenhof et al., 2007; E. M. VAN GREVENHOF et al., 2007). Zudem bevorzugen die Gnitzen feuchtwarmes Wetter mit wenig Wind und sind vor allem in der Dämmerung aktiv (BRAVERMAN, 1988; Riek, 1953).

Bislang ging man davon aus, dass die Gnitzen in Island nicht beheimatet sind. 2015 berichtete die Iceland Review jedoch von einem gehäuften Auftreten einer *Culicoides*- Art, vor allem um und in Häusern, im Westen von Islands. Es traten bei Menschen Hautveränderungen nach Bissen der Gnitzen auf, bis jetzt gibt es aber keinen Anhaltspunkt dafür, dass auch Pferde betroffen sind. Da die Gnitzen jedoch nicht weit fliegen und es an der Küste zu starken Winden kommt, geht man nicht davon aus, dass die Insekten endemisch werden.

1.3. Prävalenz

Die Prävalenz des Sommerkezems liegt bei 9% (Eriksson et al., 2008; Schurink et al., 2009). Grundsätzlich können alle Rassen erkranken, aber das Sommerkezem kann je nach Umweltbedingungen, Pferdegruppen oder Familien gehäuft auftreten. Prävalenzen von bis zu 60% sind beschrieben (Littlewood, 2013; Riek, 1953).

Bei aus Island importierten Pferden ist die Prävalenz mit 26-72% signifikant höher als bei Isländern, die innerhalb des europäischen Kontinents geboren wurden und bei denen eine Prävalenz von 1,5-8,2 % beschrieben wurde (Björnsdóttir et al., 2006; Halldórsdóttir & Larsen, 1991; Lange, 2004). Dies liegt daran, dass aus Island importierte Tiere erst nach dem Import den ersten Kontakt zu den entsprechenden Allergenen haben. Dabei hat sich gezeigt, dass die Wahrscheinlichkeit, die Krankheit zu entwickeln, mit dem Alter zum Zeitpunkt des Imports steigt. Importierte Pferde, die zwischen dem siebten und zehnten Lebensmonat einen ersten Kontakt zu den auslösenden Allergenen haben, haben eine vergleichbare Prävalenz zu Pferden, die in Zentraleuropa geboren wurden (Sommer-Locher et al., 2012). Die Farbe, Größe und das Geschlecht der Tiere haben jedoch keinen Einfluss auf die Krankheit (Halldórsdóttir & Larsen, 1991; Unkel, 1985). Grundsätzlich konnte festgestellt werden, dass auf Island geborene Pferde, die nach dem Export Sommerkezem entwickelten, im Vergleich zu Pferden, die auf dem Festland geboren wurden und später Sommerkezem entwickelten, auf mehr Speicheldrüsenallergene reagieren (Novotny et al., 2021), die

allergenspezifische IgE-Reaktion stärker ist (Jonsdottir et al., 2021) und es zudem zu einer deutlicheren Th2-Reaktion kommt (Hamza et al., 2007).

1.4. Immunpathogenese

Allergien werden in 4 unterschiedliche Typen eingeteilt, diese wurden erstmalig von den britischen Pathologen Gell und Coombs 1962 beschrieben und wurden für die Veterinärmedizin übernommen (Coombs, 1962). Die Klassifikation unterteilt sich in Typ I (Anaphylaxie), Typ II (Antikörper-vermittelte zytotoxische Reaktion), Typ III (Immunkomplex-vermittelte Reaktion) und Typ IV (Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ) (Descotes & Choquet-Kastylevsky, 2001). Die Unterscheidung der einzelnen Typen ist allerdings klinisch nicht immer klar und viele Krankheiten sind durch eine Kombination mehrerer Typen gekennzeichnet.

Beim Sommereczem spielen vor allem Typ I im akuten Stadium und möglicherweise Typ IV im chronischen Verlauf eine wichtige Rolle (BAKER & QUINN, 1978; QUINN et al., 1983; Schaffartzik et al., 2012). Wenn man von der klassischen Allergie spricht, meint man in der Regel eine Typ I Reaktion, diese ist IgE vermittelt und tritt innerhalb von Sekunden bis Minuten nach Kontakt mit dem Allergen auf, oft gefolgt von einer Spätreaktion.

Das Sommereczem ist ein Typ-I Reaktion und beim Erstkontakt mit dem Antigen kommt es vorerst zu einer symptomlosen Sensibilisierung, das bedeutet das IgE - Antikörper gegen das entsprechende Allergen gebildet werden. In der Haut nehmen dendritische Zellen wie die Langerhans'schen Zellen das Allergen auf und wirken so als Antigenpräsentierende Zellen (APC). Sie spalten die Allergene in ihren Lysosomen in Peptide. Hautbiopsien von an IBH erkrankten Pferde zeigen in den betroffenen Bereichen deutlich mehr Langerhans'sche Zellen mit erhöhter dendritischer Aktivität im Vergleich zu gesunden Bereichen, in denen inaktive Zellen überwiegen (Kurotaki et al., 2002).

Der Haupthistokompatibilitätskomplex II (Major histocompatibility complex MHC II) kodiert Klasse II Proteine, diese präsentieren die aufbereiteten Peptide an der Oberfläche den naiven T-Helferzellen. Um das Antigen an der Membran zu

erkennen, wirkt der T-Zellrezeptor an der Oberfläche zusammen mit dem Corezeptor CD4. Auch hier zeigen erkrankte Pferde eine erhöhte Anzahl CD4⁺-T-Lymphozyten (McKELVIE et al., 1999).

Die noch naiven CD4⁺-T-Lymphozyten werden durch verschiedene Stimulationen vor allem durch Zytokine wie Interleukin 4 (IL-4) zu TH2-Zellen differenziert, was eine überwiegend humorale Immunantwort bewirkt. Zudem kommt es durch die Ausschüttung von IL-4 und IL-10 aus Th0 und Th2-Zellen sowie aus Makrophagen zur Hemmung der Entwicklung von Th0 zu Th1 -Zellen. Die Differenzierung zu Th2- Zellen wird verstärkt, in dem IL-4 das von TH1-Zellen sezernierte Interferon γ (IFN- γ) hemmt. IFN- γ würde sonst die Th2-Zelldifferenzierung verhindern. Diese Mechanismen verstärken die Th2-Immunantwort und unterdrücken dabei gleichzeitig die Th1-Immunantwort (Gould et al., 2003).

IL-4 stimuliert auch die Proliferation von B-Zellen, diese bilden spezifische Antikörper. Über die von Th2-Zellen freigesetzten Zytokine IL-4 und IL-13 kommt es schließlich zum Wechsel der Antikörperproduktion der B-Lymphozyten von IgM/IgG1 zu IgE. IL-3, IL-4 und IL-10 stimulieren des Weiteren Mastzellen und IL-5 führt zu einer Erhöhung und Aktivierung der eosinophilen Granulozyten. Die Plasmazellen, die sich aus B-Zellen differenziert haben, können nun vermehrt spezifische IgE-Antikörper bilden. IgE bindet an Rezeptoren an der Membran von Effektorzellen wie Mastzellen, eosinophilen und basophilen Granulozyten und B-Zellen. Die meisten IgE Moleküle sind über Fc ϵ RI-Rezeptoren (high affinity IgE-Rezeptoren) an der Mastzellmembran gebunden. Ein erneuter Kontakt mit dem Allergen führt zur Kreuzvernetzung der an Mastzellen und basophilen Granulozyten gebundenen IgE Antikörper. Es kommt zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren. Bei basophilen Granulozyten werden hier unter anderem Histamin, Heparin, Peroxydasen und IL- 4 frei (Wagner et al., 2006), bei Mastzellen zusätzlich Tumor-Nekrose Faktor α , IFN γ , Neutrophilen - chemotaktischer Faktor und neutrale Proteasen (Janeway & Travers, 1996). Dadurch entsteht eine lokale Entzündungsreaktion mit Hautrötungen und Ödemen. Weitere chemotaktische Faktoren führen zu Leukozytenaktivierung und deren Chemotaxis (Nicolai & Meigel, 1999). Vasoaktive Substanzen stimulieren auch kutane Nervenendigungen. Eosinophile und basophile Granulozyten und Mastzellen setzen weitere Entzündungsmediatoren wie Prostaglandine, Leukotriene und Plättchen-aktivierende – Faktoren frei, und damit wird die entzündliche Reaktion weiter

aufrechterhalten.

1.5. Auslösende Allergene

Ein Protein wird laut World Health Organization WHO als Allergen angesehen, wenn es bei mindestens fünf Personen eine IgE-Antikörper-Antwort auslöst (Larsen & Løwenstein, 1996).

Ein großes Problem sowohl bei der Therapie als auch bei der Diagnostik der IBH ist sicherlich die Vielfalt an Allergenen durch verschiedene *Culicoides*-Arten in verschiedenen Regionen. Daher ist die Identifizierung der beteiligten Allergene eine der wichtigsten Grundlagen für die Entwicklung neuer Therapieformen.

Eine weitere Herausforderung sind Kreuzallergien. Pferde reagieren auch auf Allergene von *Culicoides*-Arten, die in ihrer Umgebung nicht endemisch sind (Anderson et al., 1993). Anfangs ging man auch davon aus, dass Allergene der *Simulium* (*S.*) *vittatum* (Kriebelmücken) an der Entstehung von IBH beteiligt sind, jedoch ist das Insekt in Island beheimatet (Jóhannsson, 1988) und Pferde entwickeln dort keine entsprechenden Symptome. Da die Sequenzen vom *S. vittatum* Allergen Sim v 1 und vom *Culicoides nubeculosus* Allergen Cul n 1 sich in der Sequenz ebenfalls sehr ähneln, geht man auch hier von einer Kreuzaktivität aus (Schaffartzik et al., 2012; Schaffartzik et al., 2010). Einige *Culicoides* -Allergene sind sich in der Aminosäuresequenz ebenfalls sehr ähnlich (van der Meide et al., 2013). Mittlerweile wurden in verschiedenen Studien die Speichelproteine untersucht (Russell et al., 2009; Wilson et al., 2008) und mehr als 20 rekombinante Allergene produziert. Dabei wurden verschiedene *Culicoides*-Arten untersucht, die rekombinanten Allergene stammen von *C. obsoletus* (Novotny et al., 2021; L. Peeters et al., 2013; van der Meide et al., 2013), *C. nubeculosus* (Schaffartzik et al., 2012; Schaffartzik et al., 2011) und *C. sonorensis* (Langner et al., 2009).

Unter diesen Allergenen gibt es neun sogenannte Hauptallergene, dies bedeutet, dass über 50% der erkrankten Pferde IgE gegen diese Allergene aufweisen. Eine Kombination aus sieben Allergenen bindet in den Seren erkrankter Pferde IgE mit einer Sensitivität von 90% und einer Spezifität von 96%. Diese sind Cul o 2P, Cul o 1P, Cul o 8, Cul o 10, Cul o 9, Cul o 11 und Cul o 7 (Novotny et al., 2021).

2. Symptome

Wenn Pferde erkranken, zeigen sie erste Symptome meist vor dem sechsten Lebensjahr, jedoch können erste Symptome auch in fortgeschrittenerem Alter auftreten, wenn sich die Umweltfaktoren ändern, wie zum Beispiel der Ort der Haltung. Windgeschützte Bereiche und die Nähe von Gewässern begünstigen das Entstehen der Symptomatik (Björnsdóttir et al., 2006). Das Auftreten der Symptome korreliert mit der saisonalen Aktivität der Mücken, diese treten verstärkt in den Sommermonaten auf und nehmen dann im Herbst wieder ab (Fadok & Greiner, 1990).

Die betroffenen Pferde zeigen Juckreiz in unterschiedlicher Ausprägung, vor allem an den präferierten Bissstellen der Insekten wie Mähne und Schweif. Zusätzlich kann der Pruritus an der Bauchunterseite, dem Kopf und den Ohren auftreten. Um sich Erleichterung zu verschaffen, beginnen die betroffene Tiere, sich zu scheuern oder zu beißen. Dadurch kommt es zu Sekundärläsionen wie Exkorationen, Alopezie und Krusten. Die Zerstörung der Hautbarriere begünstigt sekundäre bakterielle Infektionen. Im Verlauf der Krankheit kommt es meist zur Verschlechterung der Symptome. Chronisch betroffene Tiere zeigen deutliche Alopezie, Lichenifikation, Wunden, ödematöse Schwellungen und deutliche Verdickungen der Haut, hauptsächlich im Bereich des Mähnenkamms und Schweifes (Lange, 2004).

Wenn eine Veränderung des Fressverhaltens oder eine Erhöhung der inneren Körpertemperatur vorliegt, ist dies meist auf bakterielle Sekundärinfektionen zurückzuführen (Riek, 1953). In den meisten Fällen können die Pferde normal genutzt werden, wenn starke Symptome jedoch an Stellen wie dem Euter oder der Gurtlage auftreten, ist eine Nutzung beispielsweise als Zuchtstute oder Reitpferd oft nicht mehr möglich. Starke Abwehrreaktionen wie Kopf schütteln, können erhebliche Auswirkung auf die Nutzung als Reitpferd haben. Auch wird der Wert des Pferdes durch die Erkrankung deutlich gesenkt, was wiederum eine Auswirkung auf die Wirtschaftlichkeit des Tieres hat (Gehlen et al., 2014).

3. Diagnoseverfahren

Häufig wird die Diagnose der IBH auf Grund des Hautbilds, der Saisonalität, des Krankheitsverlaufs und dem Vorbericht erstellt. Um eine Verdachtsdiagnose abzusichern, gibt es verschiedene Möglichkeiten, die jedoch alle Vor- und Nachteile haben.

3.1. *In-Vivo* Testverfahren

Die Entnahme von Hautbiopsien mittels entsprechend großer Biopsiestanzen kann in Einzelfällen hilfreich sein. Histopathologisch können jedoch nur Differentialdiagnosen ausgeschlossen werden, Hinweise auf auslösende Allergene geben Hautbiopsien nicht. Häufig zeigt sich bei Pferden mit Sommerekzem eine chronische Dermatitis und eine Infiltration von eosinophilen Granulozyten (Pilsworth & Knottenbelt, 2004).

Beim Intradermaltest (IDT) erfolgt die Untersuchung auf Effektorzellebene. Das Antigen wird intradermal verabreicht, und führt bei Anwesenheit von allergenspezifischen IgE auf der Oberfläche von Mastzellen zur Degranulation und damit zur lokalen Ödembildung der Haut. Die Schwellung nach Allergeninjektion wird mit einer Positivkontrolle (Histamin) und einer Negativkontrolle (Allergenverdünnungsmittel) verglichen. Der IDT wird mit Gnitzen Ganzkörperextrakten durchgeführt und daher gibt es häufig falsch positive Ergebnisse, da auch Tiere ohne Anzeichen einer IBH positiv reagieren (KOLM-STARK & WAGNER, 2002; Lebis et al., 2002). Ergebnisse des IDT müssen immer im Kontext der Patientengeschichte und der Allergenexposition interpretiert werden.

3.2. *In-Vitro* Testverfahren

Blutentnahmen für *in-vitro* Verfahren werden von Patientenbesitzern und Patienten oft besser toleriert und sind im Praxisalltag deutlich einfacher und schneller durchzuführen.

Beim *zellulären Antigen-Stimulationstest* (Cellular Antigen Stimulation Test = CAST) beruht die Diagnose auf der Messung des Sulfidoleukotriengehalts (sLT). Die Leukozyten der zu testenden Pferde werden isoliert, mit *Culicoides*-Antigen inkubiert und der sLT-Gehalt im Überstand via ELISA gemessen. Dieses

Testverfahren hat eine Sensitivität von bis zu 78% und eine Spezifität von bis zu 97% (BASELGA et al., 2006).

Beim *Histamine-Release-Test* (HRT) wird gewaschenes Vollblut mit dem entsprechenden Antigen inkubiert, bei Anwesenheit von allergen-spezifischem IgE auf der Oberfläche von basophilen Granulozyten kommt es zur Degranulation und Freisetzung von Histamin, das mittels Radioimmunassay gemessen wird. Auch hier sind die Ergebnisse nicht immer zuverlässig (Wagner et al., 2008).

Eine höhere Sensitivität konnte jedoch beobachtet werden, wenn als Antigen nicht der *Culicoides*-Ganzkörperextrakt, sondern die Speichelantigene verwendet werden (Langner et al., 2008).

Ein großer Nachteil bei beiden Testverfahren ist, dass Blutproben innerhalb von 24 Stunden nach Entnahme bearbeitet werden müssen, da die Tests nur mit lebenden Leukozyten aussagekräftig sind.

Der Nachweis von *Allergen-spezifischem Serum* IgE findet meistens mittels ELISA statt. Dabei wird das equine IgE über die Bindung von spezifischen monoklonalen Antikörpern an IgE (Kalina et al., 2003; Wagner et al., 2003; Wilson et al., 2006; Wilson et al., 2008) oder mittels humanem IgE Rezeptor (FcεRIa) gemessen (Frey et al., 2008).

Im Gegensatz zu Menschen haben Pferde generell einen höheren Gesamt-IgE-Spiegel (Wagner, 2009). Auch beim Menschen kann trotz starker Symptomatik nicht immer eine Erhöhung des IgE Serumtiters festgestellt werden (Niederberger et al., 2001).

Kommerzielle, serologische IgE Tests scheinen eine geringe Sensitivität and Spezifität für das Sommerekzem zu haben. Einen Teil der erkrankten Pferde waren im Test negativ und auch gesunde Tiere zeigten stark variierende IgE-Spiegel im Serum (Frey et al., 2008). Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass Ganzkörperextrakte von laborgezüchteten Gnitzen, die selten in der Umwelt der Pferde vorkommen, als Testbestandteil benutzt wurden. Der Anteil der Speichelproteine im Ganzkörperextrakt ist zu gering, um eine ausreichende Sensitivität zu erreichen, zudem kann die hohe Anzahl an anderen Proteinen und Glykoproteinen zu einer unspezifischen IgE-Bindung führen. In einer Studie wurde gezeigt, dass die Verwendung von Extrakten aus Gnitzenarten, die in der

Umgebung der betroffenen Pferde gesammelt wurden, eine höhere Sensitivität bedingt (van der Meide et al., 2014). Da dies jedoch sehr aufwändig ist, wurden die Speichelallergene als rekombinante Proteine hergestellt. Rekombinante Allergene erhöhen die Spezifität deutlich. Allerdings sind falsch negative Resultate dann möglich, wenn betroffene Tiere keine Symptome zeigen (L. M. Peeters et al., 2013), was vermutlich auf die relativ kurze Halbwertszeit von IgE Antikörpern im Serum zurückzuführen ist. Neueste Versuche mit rekombinanten Allergenen von *C. obsoletus* zeigten, dass mit einer Kombination aus sieben rekombinanten Allergenen über 90% der erkrankten Tieren über IgE Serologie mit einer Spezifität von über 95% identifiziert werden konnten (Novotny et al., 2021).

4. Therapie

Die Therapie zum jetzigen Zeitpunkt basiert vor allem darauf, die Exposition der erkrankten Pferde durch Mückenschutz zu verringern und somit die Symptome zu reduzieren. Dazu gehören Decken, die teilweise auch mit entsprechendem Kopf und Halsschutz angeboten werden. Auch das Aufstallen in der Dämmerung, zusätzliche Fliegennetze an den Boxen, Ventilatoren in den Stallgassen sowie entsprechende Antirepellentien oder Insektizide haben sich bewährt.

4.1. Insol Dermatophyton (ID)

Hierbei handelt es sich eigentlich um einen Totimpfstoff gegen Dermatophytose. Laut Hersteller wird der Impfstoff gewichtsabhängig dosiert (unter 400kg Lebendgewicht 0,3ml, über 400 kg Lebendgewicht 0,5ml) und bis zu dreimal im Abstand von zwei Wochen tief intramuskulär verabreicht, um eine prophylaktische oder therapeutische Wirkung gegen Hautpilzkrankungen beim Pferd zu erreichen.

In einer Feldstudie mit 51 Pferden, die nachweislich unter Sommereczem litten, wurde dreimal im zweiwöchigen Abstand die doppelte Menge des Impfstoffes intramuskulär injiziert. IL-10, TNF α und IFN γ stiegen nach der Behandlung mit ID deutlich an. Daraus kann eine Verschiebung der Immunantwort von Th2 zu Th1,

also von humoral zu zell-mediiert abgeleitet werden. Es gab jedoch keinen signifikanten Unterschied im Schweregrad des Sommerekzems zwischen den behandelten Pferden und den Pferden in der Kontrollgruppe (Brunner, 2016).

4.2. Fettsäuren

Der Einsatz von Omega-3-Fettsäuren in der Behandlung von atopischen Hauterkrankungen zeigt bereits bei Menschen und Hunden gute Erfolge. Eine Verminderung des Juckreizes und den Hautläsionen konnte bei atopischen Hunden beobachtet werden, zudem verbesserte sich die Hautbarriere und es kam zu geringerem Wasserverlust über die Haut (Blaskovic et al., 2014; Tretter & Mueller, 2011). Eine Placebo-kontrollierte Studie an IBH erkrankten Pferden untersuchte die topische Behandlung mit Kerecis Smooth™. Diese Creme beinhaltet Omega-3 Fettsäuren aus Fischöl, Harnstoff und Gylkolsäure. Dabei zeigte sich keine signifikante Besserung des Juckreizes, aber eine deutliche Verbesserung des Hautbildes und damit eine Erleichterung für erkrankte Pferde. 17% der Pferde zeigten jedoch Nebenwirkungen wie erhöhten Juckreiz, Erytheme und Schwellungen (Huhmann, 2019).

4.3. Glukokortikosteroide

Der Einsatz von Glukokortikoiden dient zur schnellen Linderung des Juckreizes, hält aber meist nicht lange an und die bekannten Symptome treten erneut auf (Kleider & Lees, 1984).

Die Mastzelldegranulation wird hierbei durch Membranstabilisierung verhindert, dadurch kommt es nicht zu Bildung von Entzündungsmediatoren oder Prostaglandinen. Man sollte jedoch den Einsatz von Fall zu Fall abwägen, da die Nebenwirkungen nicht unerheblich sein können. Diese sind unter anderem Polydypsie, Muskelatrophie, Immunsuppression und auch eine verzögerte Wundheilung (Frey & Löscher, 2002). Ein möglicher Zusammenhang zwischen der oralen Gabe von Prednisolon und der Entstehung von Hufrehe konnte nicht belegt

werden (Jordan et al., 2017).

4.4. Antihistaminika

Der Einsatz von Antihistaminika ist bei Menschen mit Allergien weit verbreitet. Cetirizin, ein Histamin - H1- Antagonist der zweiten Generation, führte in einer Dosierung von 0,4mg/kg KGW zweimal täglich oral verabreicht, allerdings nicht zu einer Verbesserung bei IBH erkrankten Pferden (Olsén et al., 2008). Eine Reduzierung der Allergenexposition brachte mehr Erfolg als die Gabe von Cetirizin (Olsén et al., 2011).

4.5. Eigenbluttherapie

Durch die Injektion von hämolysiertem Eigenblut möchte man den Organismus zur Selbstheilung antreiben. Nach der Behandlung zeigte sich ein Anstieg der Monozyten im Blut um ca. 7% (Krebs, 2008). Eine Verbindung aus Eigenblut und homöopathischen Komplexpräparaten kann eine weitere Therapieoption sein, jedoch ist die Studienlage hierzu nicht eindeutig (Steidle, 2009).

4.6. Aktive Immunisierung gegen Zytokine

Ein neuer Behandlungsansatz ist die aktive Immunisierung gegen Zytokine. Dies könnte eine Alternative zur Verabreichung monoklonaler Antikörpern gegen an Juckreiz und Hautentzündungen beteiligten Zytokine sein (Marti et al., 2021). Eosinophile Granulozyten spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der IBH (Fettelschoss-Gabriel et al., 2018).

IL-5 beeinflusst maßgeblich die Differenzierung, Migration und Aktivierung sowie die Lebensdauer eosinophiler Granulozyten. Monoklonale Antikörper gegen IL-5 sind auf Grund der hohen Produktionskosten kein realistischer Therapieansatz beim Pferd. Um das Immunsystem zu umgehen, dass im Normalfall keine Antikörper gegen IL-5 bilden würde, wurde in *Escherichia-coli* produziertes IL-5 mit einem

virusähnlichen Partikel (VLP) gekoppelt. Eine spezifische Antikörper-Antwort gegen den equinen IL-5-VLP-Komplexes konnte nach 3 Injektionen erreicht werden, die eosinophilen Granulozyten im Blut der behandelten Pferde nahmen deutlich ab. Auch wurden im Gegensatz zur Kontrollgruppe weniger Hautläsionen beobachtet. In den Folgejahren reichte eine einmalige Wiederholungsimpfung, um die Läsionen weiter einzudämmen (Fettelschoss-Gabriel et al., 2019). Nebenwirkungen wurden keine beobachtet und Leber- sowie Nierenwerte nicht beeinflusst (Jonsdottir et al., 2020). Auch ein Einfluss auf Infektionen mit Endoparasiten wurde durch die Abnahme von eosinophilen Granulozyten nicht beobachtet (Fettelschoss-Gabriel et al., 2018). Zudem gab es keine Hinweise auf die Entstehung autoreaktiver T-Zellen (Jonsdottir et al., 2020). Bei Interleukin -31 handelt es sich um ein Zytokin, dass bei der Entstehung von Juckreiz beteiligt ist. Auch hier zeigte sich in einer Doppelblindstudie zur Immunisierung gegen IL-31 eine Besserung der Krankheit im Gegensatz zu Placebogruppe (Olomski et al., 2020).

4.7. Allergen (-spezifische) Immunotherapie (AIT)

Die Allergen (-spezifische) Immunotherapie (AIT) ist der einzige kausale Therapieansatz in der Behandlung von IgE -vermittelten Allergien. In der Humanmedizin wurden bereits 1911 erste Erfolge bei der Therapie von Graspollenallergien berichtet (Noon, 1911). Bei der atopischen Dermatitis des Hundes ist die subkutane AIT eine Alternative zur symptomatischen Therapie (Mueller et al., 2018). Bei Katzen zeigen sich vergleichbare Erfolge in der Behandlung des felines atopischen Hautsyndroms (Moriello et al., 2007; Mueller et al., 2018).

Das Ziel der AIT ist es die Immuntoleranz wiederherzustellen und dadurch die klinische Symptomatik zu verbessern. Hierfür werden die verursachenden Allergene in regelmäßigen Abständen subkutan, intralymphatisch oder sublingual verabreicht, um eine Toleranz gegenüber den Allergenen zu erreichen. Bei der sublingualen und subkutanen Applikation, ist zu beachten, dass eine Behandlungsdauer von einem Jahr bis hin zu drei Jahren notwendig ist (Dorofeeva et al., 2021; Mueller et al., 2018). Dabei konkurriert das allergen-spezifische IgE

mit allergen-spezifischem IgG, dass durch Bindung an das Allergen dieses blockiert. Ein weiteres Ziel ist es, die Th2-Immunantwort in Richtung Th1 zu verschieben.

Auch bei der Behandlung des equinen Sommerekzems wird die AIT als kausale Therapieform seit längerer Zeit untersucht. Studien mit einem kommerziellen *Culicoides* Ganzkörperextrakt zeigen jedoch sehr unterschiedliche Ergebnisse. In einer Doppelblindstudie zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Verbesserung der klinischen Symptomatik nach Desensibilisierung mit *Culicoides* Ganzkörperextrakt (J. L. BARBET et al., 1990). In einer weiteren Placebo-kontrollierten Studie mit 20 Pferden wurde ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den mit kommerziellen Ganzkörperextrakten behandelten und den nicht behandelten Tieren festgestellt (Ginel et al., 2014). Im Gegensatz dazu zeigten acht von zehn Pferden, denen wöchentlich eine steigende Dosis *Culicoides* selbstgefertigten Rohextrakts subkutan verabreicht wurde, eine signifikante Besserung der Symptome im Vergleich zur Kontrollgruppe. Im zweiten Jahr wurde mit einer Erhaltungsdosis bei sechs Pferden eine anhaltende Besserung der Symptome beobachtet und nach dem zweiten Jahr waren drei Pferde symptomfrei (Anderson et al., 1996). Die unterschiedlichen Ergebnisse der AIT bei der Behandlung des Sommerekzems können vermutlich auf die Verwendung von unterschiedlichen Mengen unterschiedlicher *Culicoides* Ganzkörperextrakte zurückzuführen sein. Gnitzen-Speichelproteine sind sehr heterogen und es gibt viele verschiedene Arten von Speichelproteinen, die eine allergische Reaktion auslösen können. Ein Ganzkörperextrakt enthält zwar viele Proteine, aber nicht alle können in ausreichender Menge oder Qualität vorhanden sein, um eine vollständige Desensibilisierung auszulösen. Es ist daher möglich, dass die Desensibilisierung mit einem Ganzkörperextrakt nicht ausreichend wirksam ist, um einen entsprechenden Behandlungserfolg zu erzielen (Marti et al., 2021). Ein neuer Ansatz in der AIT des Sommerekzems ist die Anwendung rekombinanter Allergene. Eine intralymphatische Injektion dieser Allergene bietet keine Vorteile zur subkutanen Injektion, als Adjuvans sind Monophosphoryl Lipid A (MPLA) mit Aluminum Hydroxid (alum) am besten geeignet sind (Jonsdottir et al., 2016).

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. Zielsetzung

Die AIT in der Tiermedizin bekommt immer mehr Bedeutung und der Einsatz dieser Therapieform könnte auch in der Behandlung der IBH ein neuer Ansatz in der Therapie werden.

Ziel dieser Doppelblind-Studie war es zu untersuchen, ob eine Behandlung mit rekombinanten Allergenen eine Besserung bei bereits an IBH erkrankten Pferden erwirken kann

2. Publikation

Die folgende Studie wurde in *Frontiers of Allergy* zur Veröffentlichung akzeptiert.



OPEN ACCESS

EDITED BY

Franziska Roth-Walter,
University of Veterinary Medicine Vienna,
Austria

REVIEWED BY

Wayne Robert Thomas,
University of Western Australia, Australia
Jose Luis Subiza,
Inmunotek SL, Spain

*CORRESPONDENCE

Eliane Marti

✉ eliane.marti@unibe.ch

RECEIVED 19 July 2024

ACCEPTED 26 August 2024

PUBLISHED 30 September 2024

CITATION

Graner A, Mueller RS, Geisler J, Bogenstätter D,
White SJ, Jonsdottir S and Marti E (2024)
Allergen immunotherapy using recombinant
Culicoides allergens improves clinical signs of
equine insect bite hypersensitivity.
Front. Allergy 5:1467245.
doi: 10.3389/falgy.2024.1467245

COPYRIGHT

© 2024 Graner, Mueller, Geisler, Bogenstätter,
White, Jonsdottir and Marti. This is an
open-access article distributed under the
terms of the [Creative Commons Attribution
License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or
reproduction in other forums is permitted,
provided the original author(s) and the
copyright owner(s) are credited and that the
original publication in this journal is cited, in
accordance with accepted academic practice.
No use, distribution or reproduction is
permitted which does not comply with
these terms.

Allergen immunotherapy using recombinant *Culicoides* allergens improves clinical signs of equine insect bite hypersensitivity

Anneli Graner¹, Ralf S. Mueller¹, Johanna Geisler^{2,3},
Delia Bogenstätter², Samuel J. White⁴, Sigridur Jonsdottir⁵ and
Eliane Marti^{2*}

¹Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig Maximilian University Munich, Munich, Germany, ²Clinical Immunology Group, Division of Neurological Sciences, Department of Clinical Research—VPH, Vetsuisse Faculty, University of Bern, Bern, Switzerland, ³Graduate School for Cellular and Biomedical Sciences, University of Bern, Bern, Switzerland, ⁴Centre for Applied Innovation, York St John University, York, United Kingdom, ⁵Institute for Experimental Pathology, Biomedical Center, University of Iceland, Keldur, Reykjavik, Iceland

Introduction: Insect bite hypersensitivity (IBH) is an IgE-mediated allergic dermatitis of horses caused by bites of *Culicoides* spp., sharing some common features with human atopic dermatitis. Allergen immunotherapy (AIT) using *Culicoides* whole-body extracts has limited efficacy. This study aimed to evaluate AIT with a pool of major *Culicoides* recombinant allergens in a prospective, double-blinded, placebo-controlled study.

Methods: The IBH lesion score was assessed during a pre-treatment year and first treatment year (May–October) in 17 horses and in May and July of a second treatment year. Nine horses were immunized subcutaneously 3x with a combination of nine r-allergens (20 µg each/injection) in alum and monophosphoryl lipid A (MPLA). Eight horses received a placebo. The immunization was repeated twice the following year. The specific antibody response to one of the AIT *Culicoides* r-allergens was assessed.

Results: In the first treatment year, the decrease in average IBH lesion score was significantly larger in the AIT compared to the placebo group, with 67% of the AIT group and 25% of the placebo horses reaching >50% improvement of the average IBH lesion score. The response to the AIT was enhanced in the 2nd treatment year when 89% of the AIT vs. 14% of the placebo horses showed an improvement ($p \leq 0.01$). IgG antibodies of all subclasses were induced, with IgG4/7 showing the most significant differences between groups. The post-AIT sera showed IgE blocking activity.

Discussion: AIT using only a few injections of small amounts of r-allergens in alum and MPLA as immunomodulators seems a promising approach for the treatment of insect bite allergy.

KEYWORDS

allergen immunotherapy, horse, insect bite hypersensitivity, *Culicoides*, recombinant allergens

1 Introduction

Equine insect bite hypersensitivity (IBH), also named *Culicoides* hypersensitivity (CH), is the most common skin disease in horses (1, 2), with an overall prevalence of 10%, and as high as 50% in horses imported from Iceland to continental Europe and some horse families (3–5). This highly pruritic allergic dermatitis is caused by an IgE-mediated hypersensitivity reaction to salivary proteins from *Culicoides* midges which

secrete into the skin a cocktail of various proteins that facilitate their blood meal (6). Although the allergens differ, IBH has some common features with human atopic dermatitis (7) and is thus a natural model of allergy. There is presently no satisfactory treatment available for IBH.

Allergen immunotherapy (AIT) is the only disease-modifying treatment for IgE-mediated allergy (8). AIT influences the immune response at multiple levels to induce tolerance. It leads to an early reduction in the degranulation of mast cells, immune deviation from a Th2- to a Th1-response, induction of regulatory T cells (Treg) and B cells, and induction of allergen-specific IgG. These IgG antibodies inhibit mast cell activation through their binding to FcεRIIb and neutralize free allergens (8). An efficacious AIT is thus associated with a dampening of various proinflammatory responses while inducing strong regulatory counterparts. Similar mechanisms have been described in animals (9).

The effect of AIT as a treatment for IBH is controversial: while some studies showed a beneficial effect (10), placebo-controlled studies using commercial *Culicoides* extracts could not demonstrate significant differences between AIT and placebo (11, 12). A potential reason for this lack of response is the use of crude *Culicoides* whole-body extracts (WBEs) for AIT. Studies in human patients have shown a poor response when using crude, complex extracts in comparison to pure allergen preparations (13). Therefore, the specific *Culicoides* allergens associated with IBH were identified and 30 *Culicoides* proteins derived from salivary glands from *Culicoides sonorensis*, *Culicoides nubeculosus*, and *Culicoides obsoletus* have been produced as recombinant proteins (14). Using microarray technology, nine of these allergens were identified as major allergens for IBH in horses of various breeds including Icelandic horses (6).

To develop an immunization protocol for a preventive AIT, studies in non-allergic horses in Iceland compared various protocols using *Culicoides* r-allergens (15). The effects of the TLR-4 ligand monophosphoryl lipid A (MPLA), which is used in some AIT preparations for the treatment of allergic human patients (16) were also investigated in horses. *In vitro* and *in vivo* studies have shown that MPLA favors IL-10 while decreasing IL-4 production (15, 17) and that the immune response following subcutaneous or intralymphatic vaccination with r-allergens combined with alum and MPLA is similar (18).

The aim of this study was to investigate whether subcutaneous AIT of IBH-affected horses with a pool of major *Culicoides* r-allergens using alum and MPLA as adjuvants could improve clinical signs of IBH and gain an insight into the associated antibody response.

2 Material and methods

2.1 Study design

This was a prospective, double-blinded, placebo-controlled study. The protocol was approved by the Bavarian government under the number ROB-55-2-2532.Vet_02_20_20.

2.2 Study objects

In total, 17 privately owned Icelandic horses, all living in the same region near Munich in Bavaria, Germany, with ages ranging from 4 to 28 years were included in the study. All of them were diagnosed with IBH based on clinical presentation. All showed at least 2 years of typical skin lesions, strong pruritus, hair loss, and, in some cases, secondary bacterial infections, especially at the mane, tail, and dorsal and ventral midline during the insect season. All were protected from insect bites by blankets and/or stabling and/or the use of a topical lotion containing 25% benzyl benzoate. Thirteen horses were treated orally with an herbal solution with a repellent effect according to the manufacturer's instructions (Ökozoon, Einhorn, Osterholz-Scharmbeck, Germany). No changes in the treatment of the individual horses were made during the whole duration of the study.

2.3 Clinical evaluation

All horses were scored monthly by the same clinician and the owner from April until October during two subsequent years, consisting of the pre-treatment and the first treatment years (Supplementary Figure 1).

A standardized scoring system adapted from Olsen et al. (19) was used as an *IBH lesion score*. Briefly, each half of the horse's body was divided into 13 different zones, such as the head, hind legs, and neck. (19). In each zone, the clinical lesions such as crusts, lichenification, or excoriations were scored on a scale from 0 = healthy skin with no lesions to 3 = severe clinical lesions. The total score was calculated by adding the individual scores.

To determine a *pruritus score*, each horse owner had to score her/his horse twice weekly every fourth week during the insect season at the same time of the day using a modified scoring system by Friberg and Logas (20). Briefly, the owner had to observe the horse for 15 seconds (s) and record every pruritic act such as rolling, biting, stamping, scratching, or head shaking. Every act over a period of 15 s was awarded one point. The same occurred during the second subsequent period of 15 s in the same week. The sum of the points from both observations formed the monthly pruritus score.

In addition, the owner assessed the *overall hair coat and skin quality* monthly. The score was either 0 (healthy and normal), 1 (mild changes), 2 (mild to moderate changes), 3 (moderate changes), or 4 (severe changes).

2.4 Blood sampling

In the first treatment year, blood samples were taken by the clinician during each visit. Blood was taken from the left jugular vein into serum tubes (Vacuette, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany), centrifuged (5000 rpm) for 10 min at room temperature, and the serum was kept frozen until further evaluation.

2.5 Treatment intervention

The horses were assigned to a placebo ($n = 8$) and a verum group ($n = 9$) to have balanced groups with regards to stables, the origin of the horse [born in Iceland and exported to Germany (IS) or born and living in Germany (DE)], age, and genders (Table 1). The horse owners and the clinician who immunized the horses and evaluated the clinical signs were all blinded.

Horses were vaccinated subcutaneously into the left neck at the start of spring (March) and 4 and 16 weeks later. Nine horses were vaccinated with a pool of nine recombinant *Culicoides* allergens. The vaccine consisted of 20 µg each of eight *Culicoides obsoletus* (Cul o) recombinant (r-) allergens (Cul o 1P, Cul o 2P, Cul o 3, 5, 7, 8, 9, 11) and one *Culicoides nubeculosus* (Cul n) r-allergen (Cul n 4). All were produced in *Escherichia coli*, purified as described (6), and sterile filtrated before use. A mixture of 50 µg MPLA (MPLA-SM VacciGrade, InvivoGen, Toulouse, France, cat#vac-mpla2) and 500 µg aluminum-hydroxide-gel (Alhydrogel® 2%, InvivoGen, cat#vac-alu-50) was used as adjuvants as described previously (18). Allergens were chosen based on their relevance for IBH in Icelandic horses (6). The eight horses of the placebo group were vaccinated with 0.4 ml of sterile saline solution. All horses were examined prior to vaccination to ensure that the horses were healthy otherwise.

Based on the results from the first treatment year, the study was adapted and extended until July of the following year (second treatment year) on a slightly reduced number of horses with limited monitoring, only consisting of the assessment of the IBH lesion score in May and July by the clinician who was still blinded. In this second treatment year, the placebo ($n = 7$) and treatment horses ($n = 9$) were vaccinated in May and July as described above (Supplementary Figure 1).

2.6 Sensitization pattern to recombinant *Culicoides* allergens using a microarray

Allergen-specific IgE was determined in the sera taken during the summer of the pre-treatment year using the same microarray as described in Novotny et al. (6). The results are displayed as a percentage of IgE-positive horses for each single allergen.

2.7 Determination of allergen-specific serum IgE and IgG levels by ELISA

Serum levels of allergen-specific antibodies were measured in the sera taken at 10 different time points (March, April, May, June, July, August, September, and October in 2021, and May and July in 2022)

TABLE 1 Horses used in the study.

Horse group	Mean age in years (range)	Male/female	Country IS/DE
Placebo	12.4 (4–23)	3/5	6/2
AIT	14.8 (5–28)	3/6	7/2

All horses belonged to the Icelandic breed. Some were born in Iceland and imported to German (IS) and the others were born and live in Germany (DE).

in all horses using the most relevant *Culicoides* r-allergen included in the AIT (Cul o 8) and, for comparison, a *Culicoides* r-allergen not included in the AIT (Cul o 10). The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was carried out as described previously (18, 21) but using 384-well plates (Immunolon 4HBX, Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY, USA). Accordingly, volumes of 50 µl per well were used, except for blocking, where 80 µl were applied. For IgE detection, samples were run in duplicates, while triplicates were used for IgG determination. Briefly, plates were coated with the recombinant *Culicoides* r-allergens Cul o 8 and Cul o 10, expressed in insect cells and purified as described (18), diluted to 1 µg/ml in 0.2M carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.4 (Thermo Fisher Scientific). Non-specific binding sites were blocked with 5% dried milk powder and 5% Tween 20 in phosphate buffered saline (PBS). Sera from the study horses as well as positive and negative control sera were diluted in blocking buffer, 1:10 for IgE and 1:800 for IgG determination, added to the plates, and incubated overnight at 4°C. After washing, anti-equine IgE [clone 3H10; (22)] or anti-equine IgG1, IgG4/7, or IgG5 were added (23). After incubation and washing, an alkaline phosphatase (AP) labeled goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch, Ely, UK, Cat# 115-055-071, RRID: AB_2338535) was added. For pan IgG detection, an AP-labeled goat anti-horse IgG-Fc (Jackson ImmunoResearch Cat# 108-055-008, RRID: AB_2337493) was used. Plates were developed with p-nitrophenyl phosphate (PNPP) in 10% diethanolamine buffer, pH 9.8. Absorbance was measured at 405 nm. Blank values were subtracted and mean values were calculated.

2.8 Competitive inhibition ELISA

The ability of the horse sera to block IgE binding of IBH-horses to Cul o 8 was tested in an inhibition ELISA performed as previously described (21). Briefly, the ELISA plates were coated with Bac Cul o 8 and blocked as described above. Three pools of sera from the AIT or placebo group containing the same amount of serum from each of the horses within each group, taken before vaccination (March), after the third vaccination (August of the first treatment year), and in the second treatment year (July) were serially twofold diluted (1:10–1:160) and added to the plate. After incubation for 1 h at 37°C, serum from an IBH-affected horse with high IgE to Cul o 8 was added. The ELISA was then carried out as described above. The percentage of inhibition for each dilution of the pre- and post-vaccination serum pools was calculated.

2.9 Statistics

Graphs and statistical analyses were done in GraphPad Prism 10.2.2 (www.graphpad.com). As the data were not always distributed normally (Shapiro–Wilk Test), means and standard deviation or medians and interquartile range were plotted. Clinical lesion score, pruritus, and owner assessment scores were calculated for each month.

A comparison of the scores between the AIT and placebo groups was carried out for each month using a *t*-test (Figure 1).

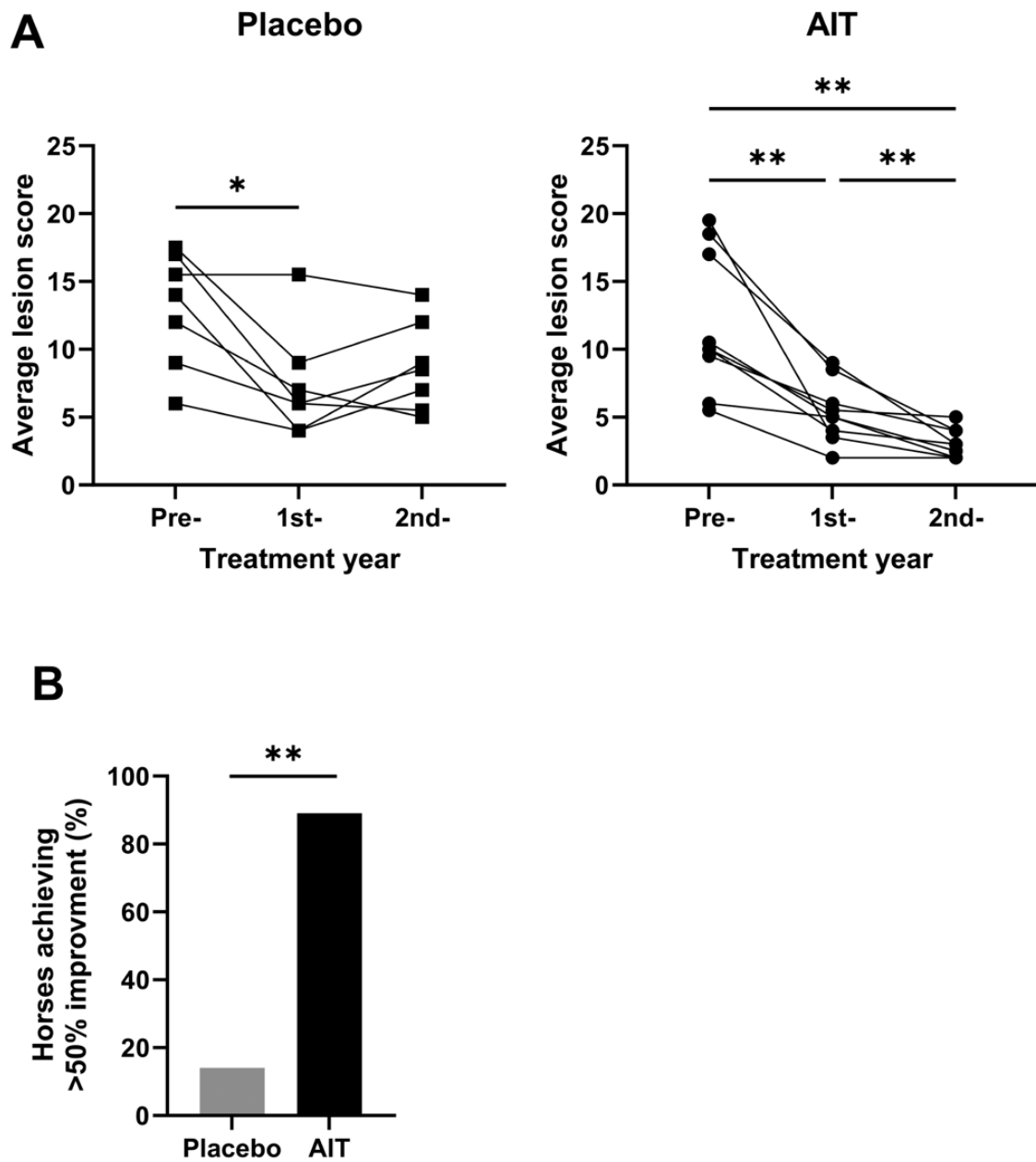


FIGURE 3
 Response to AIT in the second treatment year. (A) Changes in the average lesion scores (May and July) between the pre-, first, and second treatment years in the placebo and AIT groups. A paired ANOVA with the Holm–Sidak multiple comparison test was used to compare the three time points. * $0.01 \geq p \leq 0.05$; ** $p < 0.01$. (B) Percentage of horses reaching >50% improvement in the average lesion score (May and July) in the second treatment year compared to the pre-treatment year. ** $p < 0.01$ in the two-sided Fisher’s exact test.

3 Results

The monthly IBH lesion scores of the AIT and placebo groups over the complete duration of the study are shown in Figure 1.

3.1 IBH lesion score in the first treatment year

In both the placebo and treatment group, there was a reduction in the IBH lesion score in the treatment year

compared to the pre-treatment year. There were no significant differences between the groups for any of the single time points in the pre- and first treatment years, although, in September and October, the mean IBH score started to diverge between the groups (Figure 1). Assessment of the IBH lesion score showed that 67% of the AIT and 25% of the placebo horses reached >50% improvement in the first treatment year (Figure 2A, ns). The decrease (Δ) in the average IBH lesion score between the treatment and pre-treatment year was significantly larger in the AIT compared to the placebo group

(median = -8.83 in the AIT vs. -2.75 in the placebo group, $p < 0.05$; Figure 2B).

3.2 IBH lesion score in the second treatment year

The AIT effect was more pronounced in the second treatment year. Both in May and July, the IBH lesion score was significantly lower in the AIT compared to the placebo group (Figure 1). In the placebo group, the average IBH lesion score slightly increased from the first to the second treatment year (Figure 3A, ns). In contrast, the average IBH lesion score in the AIT group significantly decreased between the first and second treatment years (Figure 3A) and the variability of the scores was lower in the AIT group compared to the placebo group. Accordingly, 89% of the AIT horses but only 14% of the placebo horses achieved $>50\%$ improvement in the second compared to the pre-treatment year (Figure 3B, $p < 0.01$).

3.3 Owner assessment

The *pruritus score* decreased significantly in the treatment compared to the pre-treatment year in both the placebo and AIT groups, but the difference was more pronounced in the AIT group (Figure 4A). Owner assessment of the *hair coat and skin* showed a significant reduction of the score in the AIT group in the treatment compared to the pre-treatment year ($p < 0.01$). A reduction in the score was observed in all AIT horses (Figure 4B). In the placebo group, there was much more variability in score changes between the pre-treatment and treatment years. The difference between the treatment and pre-treatment years was not significant in the placebo group. Direct comparison between the AIT and placebo groups for pruritus or haircoat and skin scores did not result in any significant differences between the groups.

There was a strong correlation between the owner skin assessment and the IBH lesion scores (Spearman's rank correlation coefficient = 0.74 , $p < 0.0001$), while the correlation between the pruritus and the IBH lesion scores was moderate (0.49 , $p < 0.0001$).

3.4 Sensitization pattern to recombinant *Culicoides* allergens using a microarray

In the summer of the pre-treatment year, between 71% and 93% of the horses had positive IgE values to the single *Culicoides* allergens included in the vaccine, except for Cul o 5, where only 43% of the study horses had a positive IgE result (Figure 5A). The horses also showed varying sensitization patterns to the other eight *Culicoides obsoletus* allergens of the microarray not included in the vaccine (Figure 5B).

A similar pattern of sensitization to the vaccine allergens was observed in the AIT and placebo groups, except for Cul o 5 to

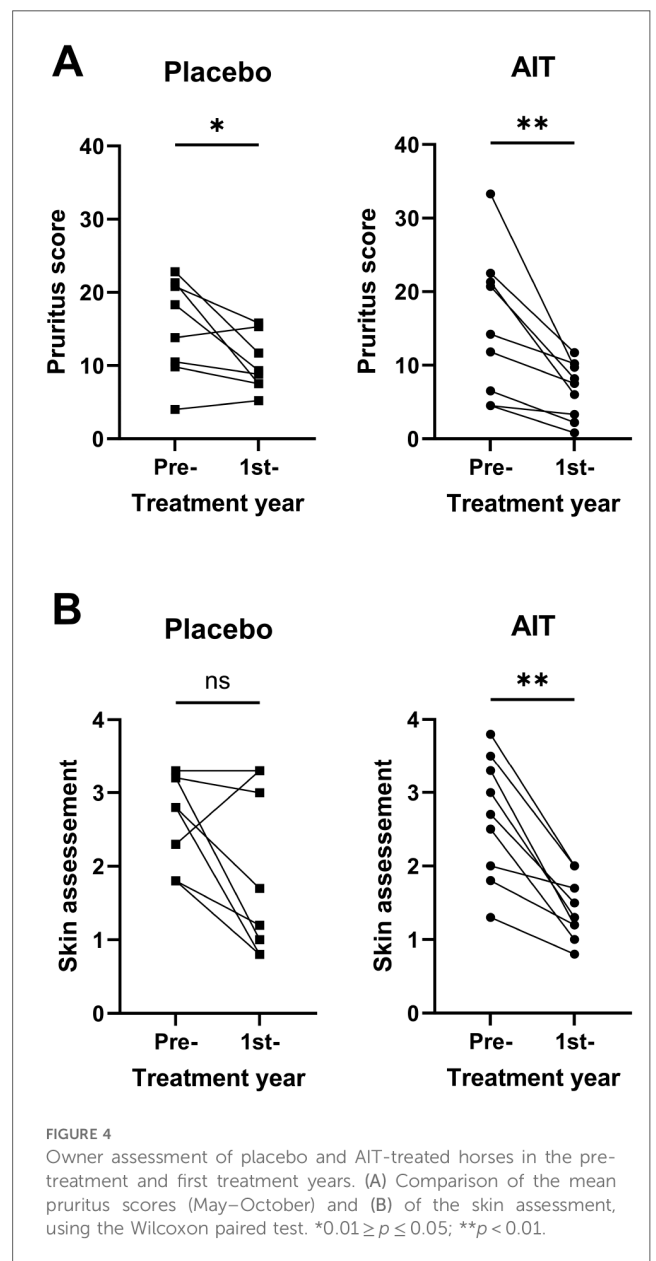
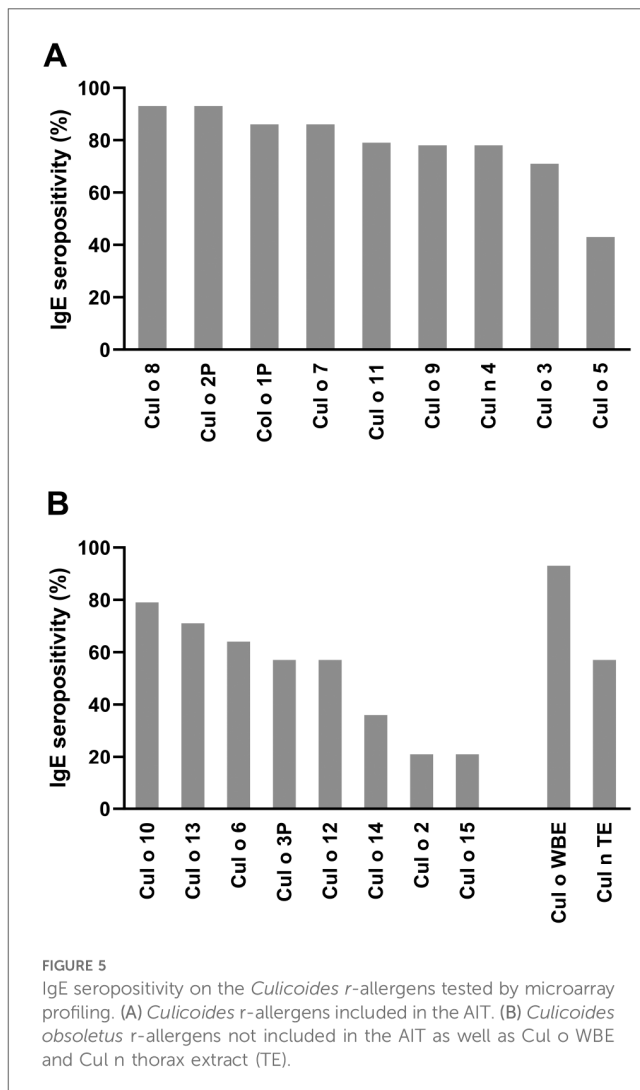


FIGURE 4
Owner assessment of placebo and AIT-treated horses in the pre-treatment and first treatment years. (A) Comparison of the mean pruritus scores (May–October) and (B) of the skin assessment, using the Wilcoxon paired test. * $0.01 \geq p \leq 0.05$; ** $p < 0.01$.

which only 20% of the AIT vs. 80% of the placebo group were IgE positive (Supplementary Figure 2). The AIT horses were sensitized to a mean number of 6.9 of the nine vaccine allergens (range 0–9). The placebo horses were sensitized to almost the same number of allergens (mean = 7.4 allergens, range 2–9 allergens).

3.5 Allergen-specific serum IgE and IgG antibodies

As shown for the AIT allergen Cul o 8 (Figure 6A), IgE serum levels did not differ significantly between the placebo and AIT groups (Brunner–Langer model). However, there was a significant variation over time in Cul o 8-specific IgE levels ($p \leq 0.05$) as well as a significant ($p \leq 0.05$) interaction between group and time: changes over time in IgE levels showed a



different pattern in the AIT group and in the placebo group. In the AIT group, IgE levels to Cul o 8 had already increased 4 weeks after the first immunization, i.e., in April, and decreased in May, after the second immunization. In the placebo group, IgE started to increase only in May, i.e., 1 month later than in the AIT group, probably because of exposure to *Culicoides*. Later, median IgE levels remained similar in both groups until May of the next year, but then they decreased in the AIT group and increased in the placebo group. IgE levels to Cul o 10, an allergen not included in the vaccine, were higher in the AIT group but the difference was not significant. Cul o 10-specific IgE also varied over time ($p \leq 0.01$) but the changes were parallel in both groups (Figure 6A) and thus there was no significant interaction between group and time in the Brunner–Langer model.

IgG levels increased after immunization in the AIT group (Figure 6B), and, consequently, IgG levels to Cul o 8 were significantly higher in the AIT compared to the placebo group (Brunner–Langer model, $p < 0.05$). IgG to Cul o 8 varied significantly over time ($p < 0.001$) and the interaction between group and time was significant ($p < 0.05$). IgG levels to Cul o 10 did not differ significantly between the groups, as shown in

Figure 6B. They only varied slightly over time ($p < 0.01$) and no interactions between group and time were observed.

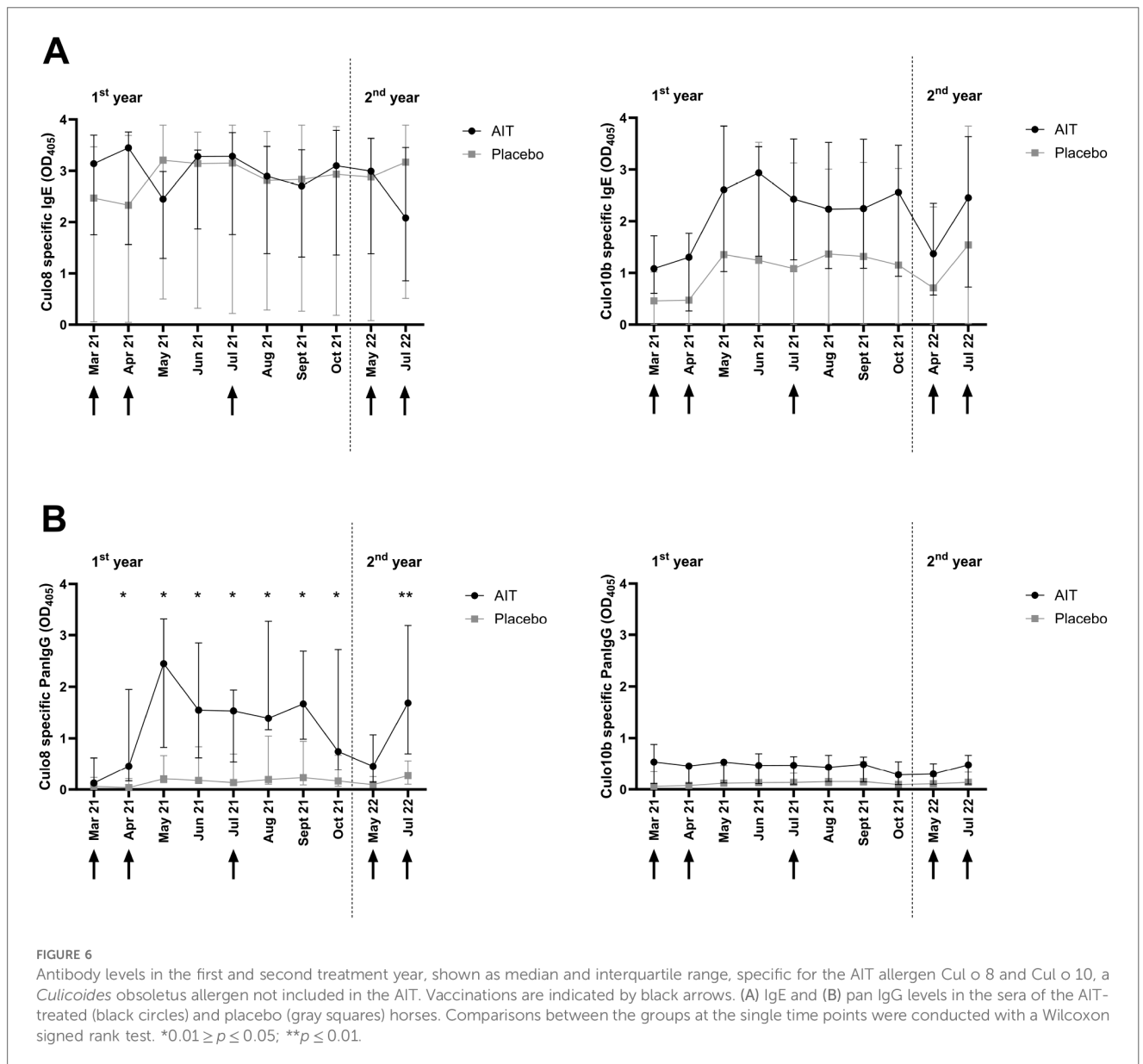
The IgG subclass response was investigated for Cul o 8 (Figure 7). Significant effects of group ($p < 0.05$) and time ($p < 0.00001$) were observed for the three tested subclasses IgG1, IgG 4/7, and IgG5. After an increase following the immunizations, all subclasses decreased until the following May. The immunization in May 2022 resulted again in an increase in all IgG subclasses. Significant interactions between the treatment group and time were observed for IgG1 and IgG4/7 ($p < 0.05$). When comparing the antibody levels to Cul o 8 at the single time points between the AIT and placebo groups, IgG1 levels were only significantly higher in the AIT compared to the placebo group in April and May, while IgG4/7 levels were significantly higher in the AIT group at all times points following the first AIT. This was similar for IgG5, except for July in the 1st treatment year. Interestingly, IgG4/7 was the only antibody class where the difference between the groups reached significance after Bonferroni correction for multiple comparisons.

3.6 Inhibition activity of the horse sera following AIT

The blocking activity of the sera was investigated for the allergen Cul o 8. AIT-induced antibodies were able to block IgE binding to this allergen. The blocking activity of the serum pool of the AIT group increased from 1.5% in the pre-immune sera to 43% after the third immunization and was similar in July of the second treatment year. The blocking activity of the serum pools taken after the AITs was dilution-dependent, i.e., it decreased almost linearly between the 1:10 and 1:160 serum dilutions. Some blocking activity was seen with the serum pools of the placebo group, but it was random and not dilution-dependent (Figure 8).

4 Discussion

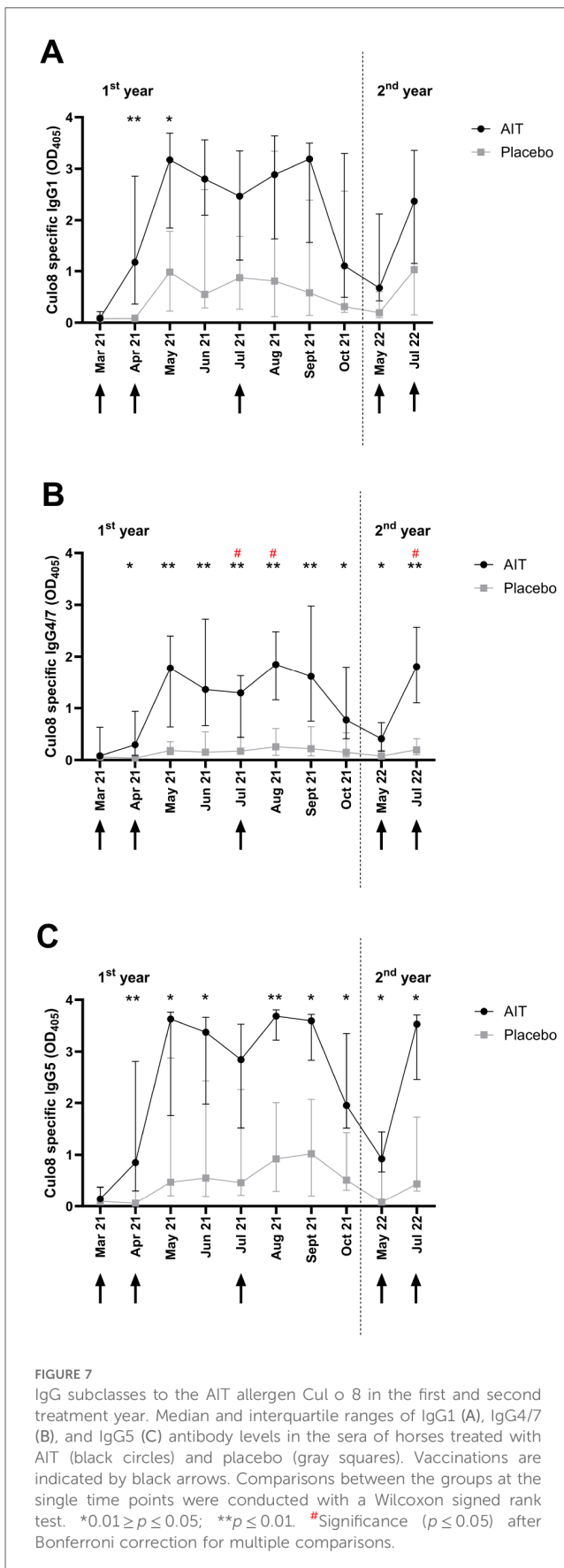
The aim of this study was to investigate the effect of AIT on the treatment of IBH by using a pool of the most relevant *Culicoides* r-allergens (6), instead of a crude *Culicoides* whole-body extract which showed no beneficial effect in placebo-controlled studies (11, 12). We decided to use a pool of major *Culicoides* r-allergens instead of a patient-tailored *Culicoides* r-allergen AIT because of the higher complexity and costs of the latter, and consequently also a higher potential of a single pool of *Culicoides* r-allergens for future commercial development. The panel of *Culicoides* r-allergens consisted of eight of the nine major allergens identified by Novotny et al. (6), and of an additional *Culicoides nubeculosus* allergen, Cul n 4, which was also a major allergen for Icelandic horses (27). The major *Culicoides* allergen Cul o 10 could unfortunately not be included in the AIT because of technical problems during production. Serum IgE profiling of the study horses using the same microarray as described in Novotny et al. (6) confirmed the relevance of the r-allergens



included in the AIT as, except for Cul o 5, >70% of the study horses had positive IgE values to the single *Culicoides* r-allergens included in the vaccine (Figure 5A). Testing on the microarray also confirmed the higher relevance of *Culicoides obsoletus* vs. *Culicoides nubeculosus* allergens, as >90% of the horses were IgE-positive to *Culicoides obsoletus* vs. only 57% to *Culicoides nubeculosus* extract, supporting the decision to preferably use Cul o allergens for the AIT. The horses also showed varying degrees of sensitization to the additional eight *Culicoides obsoletus* r-allergens of the microarray that were not included in the vaccine (Figure 5B). However, except for the leucine-rich domain (Cul o 12) and the DUF4803 superfamily (Cul o 10), all *Culicoides obsoletus* allergens that were major allergens in our study horses were represented by at least one r-allergen of the given allergen family in the AIT vaccine.

The AIT protocol used here was developed based on previous studies showing that intralymphatic immunotherapy (ILIT) with

3 injections had the same efficacy as 54 s.c. injections over 3 years (28), but that in horses, 3 s.c. injections of r-allergens induced a similar immune response as three injections into the lymph node (18). In the first treatment year, both the AIT and placebo horses improved in their IBH lesion score compared to the pre-treatment year but the AIT-treated horses had a significantly larger reduction in the average clinical lesion score than the placebo group, and this with only three subcutaneous injections. Consequently, more AIT-treated horses achieved a >50% improvement in the average clinical lesion score. The clinical improvement was also evident in the owners' assessment of skin quality and pruritus, as a more consistent improvement of the pruritus and skin assessment scores was found in the AIT compared to the placebo group. However, significant differences between the groups were only found when using the IBH lesion score from Olsen et al. (19), possibly because this scoring was more precise than the owner

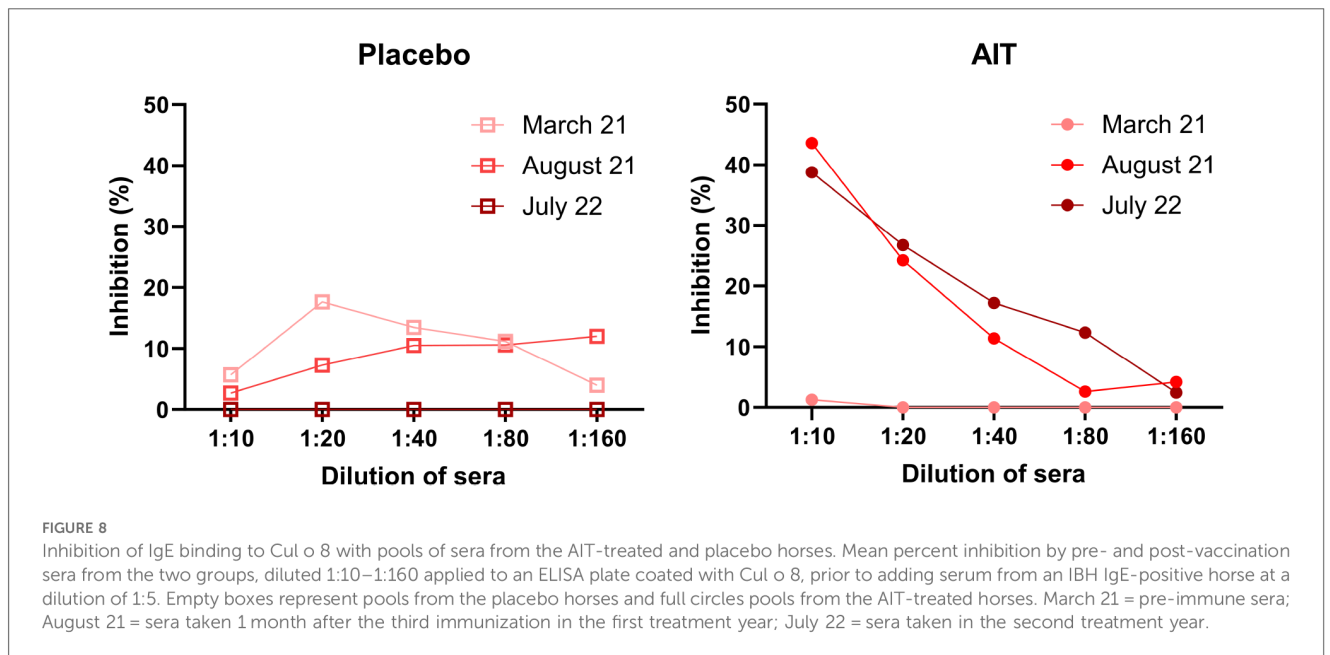


assessment. Nonetheless, the owners' skin assessment correlated well with the IBH lesion score.

The study was originally designed to last over 2 years, with a clinical IBH scoring of the patients during one pre-treatment and one treatment season. Because a first analysis of the data at the end of the original study showed that differences between the groups were starting to appear in September we tried to extend the study for a second treatment year. This was only possible until July of the following year and without the owner assessments. Both the clinician and horse owners had not been unblinded. Interestingly, in the second treatment year, the IBH lesion score further decreased in the AIT group, while it remained almost similar to the preceding year in the placebo group (Figure 3A). This resulted in significant differences between the groups in May and July (Figure 1). Almost 90% of the AIT-treated horses achieved a >50% improvement in their clinical lesion score in the second treatment year, while only 14% of the placebo horses showed such an improvement, illustrating the excellent response to the AIT in the second treatment year. Based on the results of this study, AIT should be carried out over at least 2 years, as indicated in other species. The AIT was well-tolerated with no side effects other than local swelling at the injection site in a few horses.

To gain insight into the antibody response induced by this AIT protocol, IgE and IgG subclasses were measured against two allergens, Cul o 8, one of the most relevant allergens included in the AIT, and Cul o 10, which is also a major allergen for IBH but could not be included in the AIT. As to be expected, the AIT resulted in an increase in Cul o 8-specific IgG that was not observed for Cul o 10. Horses have seven IgG subclasses, with different functions (29) but not all can be measured as a single subclass (23, 29). Based on our previous studies (30, 31), we measured allergen-specific IgG1, IgG4/7, and IgG5. All three subclasses were induced by the AIT but the most significant differences between the AIT and placebo groups were seen for IgG4/7. This can be explained by the fact that almost no IgG4/7 was induced by natural *Culicoides* exposure, while IgG1 and IgG5 also increased in the placebo group, confirming results of a previous study that showed that allergen-specific IgG1 and IgG5 are increased in IBH-affected horses (31). IgE levels specific for Cul o 8 and Cul o 10 did not differ significantly between the groups but the time course of IgE antibodies against Cul o 8 was different between the AIT and placebo groups, decreasing in the AIT group at the end of the study, while they increased in the placebo group. This late decrease of serum IgE after AIT is in accordance with the AIT mechanisms described in human patients (32). Furthermore, blocking antibodies (Figure 8) were induced by the AIT, confirming the beneficial effect in the treated patients. Ideally, natural Cul o 8 should have been used to assess the blocking activity of the sera. As natural Cul o 8 is not available, we used, as for the other ELISAs, recombinant insect cell-expressed Cul o 8, which should be the closest to the natural protein.

This study has some limitations. The data collected are partly based on personal perceptions and are dependent on factors that cannot be influenced, such as the weather, i.e., the activity of



Culicoides at the time of the evaluation of the patients. For this reason, as done in this study, it is of utmost importance to include placebo horses living in the same environment. It is known that *Culicoides* prefer warm, humid weather with little wind and are particularly active at dusk (33, 34). The placebo effect observed in our study could thus potentially also be due to climatic differences between the pre-treatment and first treatment year, as the summer of the first treatment year was particularly rainy and cold, limiting the activity of the midges. Furthermore, a true placebo effect due to closer care of the horses is also possible. A placebo effect is often observed in AIT studies, as also observed in previous IBH studies (11, 12, 24). Another limitation of this study is that the major allergen Cul o 10 was not included in the AIT because of technical difficulties. This allergen was an important allergen for our horses, as IgE serology performed on the microarray showed that 80% were sensitized to Cul o 10 (Figure 5B). The relatively small number of horses included in the study did not allow for investigation of possible effects of the origin of the horse (i.e., born in Iceland or in Germany) or of the age of the horse on the response to treatment. Nevertheless, these factors should not have influenced the results of our study as the treatment groups were balanced with regards to the origin of the horse, age, and stable.

This is the first placebo-controlled study which shows a beneficial effect of AIT for treatment of IBH. It indicates that a few injections of a pool of *Culicoides* r-allergens in combination with Alum and MPLA as immunomodulators is a promising approach for the treatment of this allergy.

Data availability statement

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Ethics statement

The animal studies were approved by Bavarian government under the number ROB-55-2-2532.Vet_02_20_20. The studies were conducted in accordance with the local legislation and institutional requirements. Written informed consent was obtained from the owners for the participation of their animals in this study.

Author contributions

AG: Data curation, Formal Analysis, Investigation, Resources, Visualization, Writing – original draft. RM: Conceptualization, Funding acquisition, Supervision, Writing – review & editing. JG: Writing – review & editing, Formal Analysis, Investigation. DB: Writing – review & editing, Investigation. SW: Writing – review & editing, Investigation, Resources. SJ: Writing – review & editing, Conceptualization, Formal Analysis, Funding acquisition, Project administration, Resources, Supervision, Visualization. EM: Conceptualization, Funding acquisition, Project administration, Supervision, Validation, Writing – review & editing.

Funding

The authors declare financial support was received for the research, authorship, and/or publication of this article. This study was supported by the Morris Animal Foundation grant No D20EQ-032 and by the Stiftung pro Pferd.

Acknowledgments

We thank the Pferdeklinik in Parsdorf, and the owners of the horses for their support. We express our gratitude to Jelena

Mirkovitch, for technical assistance with the ELISA. We are grateful to Bettina Wagner, Cornell University, NY, USA for providing the monoclonal antibodies for equine IgG subclasses.

Conflict of interest

RM received research support, or consulted or lectured for Nextmune, Synlab, and Heska Laboratories (all of which provide commercial allergen immunotherapy formulations).

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated

organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/falgy.2024.1467245/full#supplementary-material>

SUPPLEMENTARY FIGURE 1

Outline of the study over the 3 years, figure made with Biorender.

SUPPLEMENTARY FIGURE 2

IgE seropositivity on the *Culicoides* r-allergens included in the vaccine, tested by microarray profiling in the AIT and placebo groups. Except for Cul o 5 (<0.05, Pearson's chi-square test), there were no significant differences in the distribution of positive and negative test results between the AIT and placebo horses.

References

- Lindgren G, Naboulsi R, Frey R, Solé M. Genetics of skin disease in horses. *Vet Clin North Am Equine Pract.* (2020) 36(2):323–39. doi: 10.1016/j.cveq.2020.03.010
- Marsella R, White S, Fadok VA, Wilson D, Mueller R, Outerbridge C, et al. Equine allergic skin diseases: clinical consensus guidelines of the World Association for Veterinary Dermatology. *Vet Dermatol.* (2023) 34(3):175–208. doi: 10.1111/vde.13168
- Björnsdóttir S, Sigvaldadóttir J, Brostrom H, Langvad B, Sigurdsson A. Summer eczema in exported Icelandic horses: influence of environmental and genetic factors. *Acta Vet Scand.* (2006) 48:3. doi: 10.1186/1751-0147-48-3
- Eriksson S, Grandinson K, Fikse WF, Lindberg L, Mikko S, Broström H, et al. Genetic analysis of insect bite hypersensitivity (summer eczema) in Icelandic horses. *Animal.* (2008) 2(3):360–5. doi: 10.1017/s1751731107001413
- Littlewood JD. Incidence of recurrent seasonal pruritus ('sweet itch') in British and German shire horses. *Vet Rec.* (1998) 142(3):66–7. doi: 10.1136/vr.142.3.66
- Novotny EN, White SJ, Wilson AD, Stefánsdóttir SB, Tijhaar E, Jonsdóttir S, et al. Component-resolved microarray analysis of IgE sensitization profiles to *Culicoides* recombinant allergens in horses with insect bite hypersensitivity. *Allergy.* (2021) 76(4):1147–57. doi: 10.1111/all.14556
- Cvitas I, Oberhänsli S, Leeb T, Dettwiler M, Müller E, Bruggman R, et al. Investigating the epithelial barrier and immune signatures in the pathogenesis of equine insect bite hypersensitivity. *PLoS One.* (2020) 15(4):e0232189. doi: 10.1371/journal.pone.0232189
- Shamji MH, Valenta R, Jardtzyk T, Verhasselt V, Durham SR, Würtzen PA, et al. The role of allergen-specific IgE, IgG and IgA in allergic disease. *Allergy.* (2021) 76(12):3627–41. doi: 10.1111/all.14908
- Mueller RS, Jensen-Jarolim E, Roth-Walter F, Marti E, Janda J, Seida AA, et al. Allergen immunotherapy in people, dogs, cats and horses—differences, similarities and research needs. *Allergy.* (2018) 73(10):1989–99. doi: 10.1111/all.13464
- Anderson GS, Belton P, Jahren E, Lange H, Kleider N. Immunotherapy trial for horses in British Columbia with *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) hypersensitivity. *J Med Entomol.* (1996) 33(3):458–66. doi: 10.1093/jmedent/33.3.458
- Barbet JL, Bevier D, Greiner EC. Specific immunotherapy in the treatment of *Culicoides* hypersensitive horses: a double-blind study. *Equine Vet J.* (1990) 22(4):232–5. doi: 10.1111/j.2042-3306.1990.tb04258.x
- Ginel PJ, Hernandez E, Lucena R, Blanco B, Novales M, Mozos E. Allergen-specific immunotherapy in horses with insect bite hypersensitivity: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Vet Dermatol.* (2014) 25(1):29–e10. doi: 10.1111/vde.12092
- Dorofeeva Y, Shilovskiy I, Tulaeva I, Focke-Tejkl M, Flicker S, Kudlay D, et al. Past, present, and future of allergen immunotherapy vaccines. *Allergy.* (2021) 76(1):131–49. doi: 10.1111/all.14300
- Marti E, Novotny EN, Cvitas I, Ziegler A, Wilson AD, Torsteinsdóttir S, et al. Immunopathogenesis and immunotherapy of *Culicoides* hypersensitivity in horses: an update. *Vet Dermatol.* (2021) 32(6):579–e156. doi: 10.1111/vde.13042
- Jonsdóttir S, Svansson V, Stefánsdóttir SB, Schüpbach G, Rhyner C, Marti E, et al. A preventive immunization approach against insect bite hypersensitivity: intralymphatic injection with recombinant allergens in alum or alum and monophosphoryl lipid A. *Vet Immunol Immunopathol.* (2016) 172:14–20. doi: 10.1016/j.vetimm.2016.02.017
- Rosewich M, Lee D, Zielen S. Pollinex Quattro: an innovative four injections immunotherapy in allergic rhinitis. *Hum Vaccin Immunother.* (2013) 9(7):1523–31. doi: 10.4161/hv.24631
- Ziegler A, Gerber V, Marti E. In vitro effects of the toll-like receptor agonists monophosphoryl lipid A and CpG-rich oligonucleotides on cytokine production by equine cells. *Vet J.* (2017) 219:6–11. doi: 10.1016/j.tvjl.2016.11.013
- Stefánsdóttir SB, Jonsdóttir S, Kristjansdóttir H, Svansson V, Marti E, Torsteinsdóttir S. Establishment of a protocol for preventive vaccination against equine insect bite hypersensitivity. *Vet Immunol Immunopathol.* (2022) 253:110502. doi: 10.1016/j.vetimm.2022.110502
- Olén L, Bondesson U, Broström H, Olsson U, Mazogi B, Sundqvist M, et al. Pharmacokinetics and effects of cetirizine in horses with insect bite hypersensitivity. *Vet J.* (2011) 187(3):347–51. doi: 10.1016/j.tvjl.2009.12.030
- Friberg Logas. Treatment of *Culicoides* hypersensitive horses with high-dose n-3 fatty acids: a double-blinded crossover study. *Vet Dermatol.* (1999) 10(2):117–22. doi: 10.1046/j.1365-3164.1999.00147.x
- Jonsdóttir S, Hamza E, Janda J, Rhyner C, Meinke A, Marti E, et al. Developing a preventive immunization approach against insect bite hypersensitivity using recombinant allergens: a pilot study. *Vet Immunol Immunopathol.* (2015) 166(1–2):8–21. doi: 10.1016/j.vetimm.2015.05.002
- Wilson AD, Harwood L, Torsteinsdóttir S, Marti E. Production of monoclonal antibodies specific for native equine IgE and their application to monitor total serum IgE responses in Icelandic and non-Icelandic horses with insect bite dermal hypersensitivity. *Vet Immunol Immunopathol.* (2006) 112(3–4):156–70. doi: 10.1016/j.vetimm.2006.02.003
- Goodman LB, Wimer C, Dubovi EJ, Gold C, Wagner B. Immunological correlates of vaccination and infection for equine herpesvirus 1. *Clin Vaccine Immunol.* (2012) 19(2):235–41. doi: 10.1128/cvi.05522-11
- Fettelschoss-Gabriel A, Fettelschoss V, Thoms F, Giese C, Daniel M, Olomski F, et al. Treating insect-bite hypersensitivity in horses with active vaccination against IL-5. *J Allergy Clin Immunol.* (2018) 142(4):1194–205.e3. doi: 10.1016/j.jaci.2018.01.041
- Brunner E, Domhof S, Langer F. *Nonparametric Analysis of Longitudinal Data in Factorial Experiments*. New York, NY: Wiley (2002).
- Noguchi K, Gel YR, Brunner E, Konietzschke F. nparLD: an R software package for the nonparametric analysis of longitudinal data in factorial experiments. *J Stat Softw.* (2012) 50(12):1–23. doi: 10.18637/jss.v050.i12
- Birras J, White SJ, Jonsdóttir S, Novotny EN, Ziegler A, Wilson AD, et al. First clinical expression of equine insect bite hypersensitivity is associated with co-sensitization to multiple *Culicoides* allergens. *PLoS One.* (2021) 16(11):e0257819. doi: 10.1371/journal.pone.0257819

IV. ERWEITERTE DISKUSSION

Die AIT als Therapie bei allergischen Erkrankungen wird bereits seit 1911 bei Menschen mit allergischer Rhinokonjunktivitis gegen Graspollen in der Literatur erwähnt (Noon, 1911).

Die AIT ist in der Tiermedizin beim Kleintier bereits eine etablierte Behandlungsmethode bei allergischen Krankheiten. Vor allem bei Hunden, die unter atopischer Dermatitis (AD) leiden, wird diese kausale Therapieform seit langem erfolgreich eingesetzt. Bei Katzen wurde auch das feline Asthma durch AIT therapiert, jedoch ist die Studienlage hier noch deutlich weniger aussagekräftig als bei an AD erkrankten Hunden. Die AIT kann die Symptome der erkrankten Tiere verringern und eine Alternative zu einer lebenslangen medikamentösen Therapie mit entsprechenden Nebenwirkungen sein (Mueller et al., 2018).

Bei den Protokollen zur Anwendung der AIT gibt es bis jetzt noch keine festgelegten Mengen an Allergenen, klare Empfehlungen zu den Injektionswegen und Anzahl, Frequenz und Dosis der Injektionen (Mueller et al., 2018).

In der Pferdemedizin ist die Behandlung von Allergien noch nicht vergleichbar weit untersucht. Das equine Asthma (EA) und IBH sind dabei die häufigsten allergischen Erkrankungen.

Bei EA ist die AIT im Moment noch keine Behandlungsoption. Bei Menschen wird dies bereits erfolgreich eingesetzt, um eine Toleranz des Immunsystems gegen die Allergene zu erzielen (Kempe, 2022).

Bei allergischen Atemwegserkrankungen bei Pferden ist es noch unklar, welche Rolle IgE und die entsprechende Histamin-Ausschüttung spielt. Die Erkrankung scheint keine Allergie des Typ I (Soforttyps) zu sein, sondern eher vom verzögerten Typ, also Typ III oder IV (Klier et al., 2021).

In einer Studie mit 64 Pferden wurde festgestellt, dass der Serum-IgE Spiegel nicht mit dem IgE Spiegel in der BAL von an EA erkrankten Pferde korreliert. Es zeigte sich sogar, dass nur Pferde mit einer mastozytären und gemischten EA allergenspezifisches IgE in der BAL-Flüssigkeit hatten. Dies bedeutet, dass sich die Antikörperantwort auf ein lokales Geschehen beschränkt und nicht systemisch nachweisbar ist (Hansen et al., 2020). Diese Befunde erschweren es, die richtigen

Allergene zu identifizieren und somit eine zielführende AIT zu etablieren.

Bei IBH könnte die AIT eine realistische Therapiealternative werden.

IBH hat Prävalenzen von bis zu 60% (Littlewood, 2013; Riek, 1953), vor allem Isländer, die aus Island importiert werden, sind dabei sehr häufig betroffen (Björnsdóttir et al., 2006; Halldórsdóttir & Larsen, 1991; Lange, 2004). Ob die Pferde eine Hypersensibilität entwickeln, ist nicht absehbar. Wenn dies jedoch der Fall ist, senkt es den Marktwert der Tiere, zudem ist die Krankheit auch eine Belastung für die Pferde und Halter. Auch aus Sicht des Tierschutzes sind die Pferde in ihrer Haltungsform oft eingeschränkt, der Koppelgang ist während den Sommermonaten nur eingeschränkt bis gar nicht möglich. Auch die Nutzung als Reitpferd oder in der Zucht kann massiv beeinflusst werden (Gehlen et al., 2014)

Die Behandlung der IBH basiert demnach im Moment vor allem auf einer Reduzierung des Allergenkontakts und damit auf der Vermeidung von *Culicoides* - Stichen. Dies ist oft nur schwer oder unvollständig möglich und viele der betroffenen Tiere zeigen offene Stellen und Juckreiz. In besonders starken Fällen der Allergie gehen die Symptome bis in die Wintermonate, sogar das Allgemeinbefinden kann beeinflusst werden (Lange, 2004; Riek, 1953). Eine Behandlung wird in solchen Fällen dann oft mit einer systemischen Glukokortikoidtherapie durchgeführt. Dies ist jedoch nur eine kurzfristige Therapie mit nicht unerheblichen Nebenwirkungen (Kleider & Lees, 1984).

Das Sommerekzem ist eine Typ-I Reaktion und beim Erstkontakt mit dem Antigen kommt es vorerst zu einer symptomlosen Phase. Das Immunsystem wird jedoch hier bereits sensibilisiert, indem es IgE-Antikörper gegen das entsprechende Allergen bildet.

In der Haut phagozytieren dendritische Zellen wie die Langerhans'schen Zellen das Allergen und wirken so als Antigenpräsentierende Zellen (APC). Sie spalten die Zellen in ihren Lysosomen in Peptide. Hautbiopsien von an IBH erkrankten Pferden zeigen in den betroffenen Bereichen deutlich mehr Langerhans'sche Zellen mit erhöhter dendritischen Aktivität im Vergleich zu gesunden Bereichen, in denen inaktive Zellen überwiegen (Kurotaki et al., 2002).

Der Haupthistokompatibilitätskomplex II (Major histocompatibility complex MHCII) kodiert Klasse II Proteine, diese präsentieren die aufbereiteten Peptide an

der Oberfläche den naiven T-Helferzellen. Um das Antigen an der Membran zu erkennen, wirkt der T-Zellrezeptor an der Oberfläche zusammen mit dem Corezeptor CD4+. Auch hier zeigen erkrankten Pferde eine erhöhte Anzahl CD4+-T-Lymphozyten (McKELVIE et al., 1999).

Die noch naiven CD4+-T-Lymphozyten werden durch verschiedene Stimulationen vor allem durch Zytokine wie Interleukin 2 (IL-2) aktiviert und durch Zytokine wie Interleukin 4 (IL-4) zu TH2-Zellen differenziert, was bereits eine überwiegend humorale Immunantwort bewirkt. Zudem kommt es durch die Ausschüttung von IL-4 und IL-10 der Th0 und Th2-Zellen sowie den Makrophagen zur Hemmung der Entwicklung von Th0 zu Th1 -Zellen.

Die Differenzierung zu Th2- Zellen wird verstärkt, in dem IL-4 das von TH1-Zellen sezernierte Zytokin Interferon γ (IFN- γ) hemmt. IFN- γ würde sonst die Th2-Zelldifferenzierung verhindern. Diese Mechanismen verstärken die Th2-Immunantwort und unterdrücken dabei gleichzeitig die Th1-Immunantwort (Gould et al., 2003).

Die Proliferation von B-Zellen wird auch über IL-4 stimuliert und diese bilden spezifische Antikörper. Über die von Th2-Zellen freigesetzten Zytokine kommt es schließlich zum Wechsel der B-Lymphozyten von IgM/IgG1- zu IgE-produzierenden B-Zellen. Diese vermehren sich und differenzieren sich weiter zu Plasmazellen.

IL-3, IL-4 und IL-10 stimulieren des weiteren Mastzellen und IL-5 führt zu einer Erhöhung der eosinophilen Granulozyten.

Die Plasmazellen, die sich aus B-Zellen differenziert haben, können nun vermehrt spezifische IgE-Antikörper bilden. IgE bindet an Rezeptoren an der Membran von Effektorzellen wie Mastzellen, eosinophilen und basophilen Granulozyten und B-Zellen. Die meisten IgE sind über Fc ϵ RI-Rezeptoren (high affinity IgE-Rezeptoren) an der Mastzellmembran gebunden und es kommen nur wenige IgE frei im Serum vor.

Ein erneuter Kontakt mit dem Allergen führt zur Kreuzvernetzung der an Mastzellen und basophilen Granulozyten gebunden IgE-Antikörper. Es kommt über eine Sensibilisierung von Effektorzellen entweder zur Exozytose durch Verschmelzen der Vesikelmembran mit der Zellmembran oder durch Ausschleusen

intakter Vesikel zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren. Bei basophilen Granulozyten werden hier unter anderem Histamin, Heparin und Peroxydasen frei, bei Mastzellen zudem verschiedenste Zytokine wie Tumor-Nekrose Faktor α , IFN γ , Neutrophilen chemotaktischer Faktor und neutrale Proteasen (Janeway & Travers, 1996).

Es kommt dadurch zur lokalen Entzündungsreaktion, durch vasoaktive Substanzen entstehen Hautrötungen und durch erhöhte Gefäßpermeabilität kommt es zu Ödemen. Weitere chemotaktische Faktoren führen zu Leukozytenaktivierung und deren Chemotaxis (Nicolai & Meigel, 1999). Der Juckreiz, an dem betroffene Pferde leiden, wird über Stimulation kutaner Nervenendigungen unter anderem durch vasoaktive Substanzen ausgelöst.

Über die Aktivierung der Phospholipase 2 setzen basophile Granulozyten und Mastzellen weitere Entzündungsmediatoren wie Prostaglandine, Leukotriene und Plättchen-aktivierende – Faktoren frei und damit wird die entzündliche Reaktion weiter aufrechterhalten. Eosinophile Granulozyten induzieren durch das Freisetzen zytotoxischer Proteine die Produktion von Leukotrienen und Prostaglandinen. Dadurch werden vermehrt eosinophile Granulozyten an den Ort der Entzündung gelockt und diese damit aufrecht erhalten (Steidle, 2009).

Die Typ-IV Reaktion ist im Gegensatz zu Reaktionen von Typ I-III nicht Antikörper vermittelt, sondern zellvermittelt. Die allergische Reaktion tritt wie bei Typ I auch nach einer zweiten Allergenexposition auf, jedoch nicht sofort, sondern deutlich verzögert nach 24-72 Stunden. Deshalb wird Typ I auch als Soforttyp und Typ IV als verzögerter Typ beschrieben, Kombinationen der verschiedenen Typen kommen natürlich auch vor.

Nach einer Allergenexposition kommt es auch beim Typ IV zu Reaktion mit den Langerhans'schen Zellen, jedoch werden diese nach Beladung mit dem Antigen zu einem regionären Lymphknoten gebracht. Dort entwickeln sie sich zu antigenspezifischen naiven T-Zellen. Diese verlassen als T-Blasten den Lymphknoten und kommen über efferente Lymphgefäße in die Blutbahn. Bei erneutem Kontakt der Haut mit dem Allergen und Präsentation über Langerhan'sche Zellen, erkennen sie dieses über ihre antigenspezifischen Rezeptoren und werden so aktiviert. Durch antigenspezifische Aktivierung sekretieren CD-4+ und CD8+-Zellen Zytotoxine oder entwickeln zytotoxische Aktivität. Ein geringer Anteil dieser Zellen

entwickeln sich zu CD4⁺-TH1 Zellen, die als Gedächtniszellen langfristig über APC präsentierte Antigen erkennen. Sie werden bei erneutem Kontakt mit dem Antigen direkt aktiviert und es kommt sofort zu Abwehrmechanismen des Immunsystems.

Eine kausale Therapie der IBH kann von großer Bedeutung für die betroffenen Pferde sein, aber auch wirtschaftliche Auswirkungen haben, da Pferde die an IBH erkrankt sind einen Wertverlust zeigen (Gehlen et al., 2014)

Behandlungsversuche mit Ganzkörperextrakten von Gnitzen als Allerge zeigte eher kontroverse Ergebnisse. In zwei placebo-kontrollierten Studien mit Ganzkörperextrakten gab es zwar eine Besserung der IBH Symptome, aber es gab keinen Unterschied zwischen Placebo und Verumgruppe. (Barbet et al., 1990; Ginel et al., 2014). In einer weiteren Studie, in der die Pferde erst mit einer zunehmenden Dosis an *Culicoides* Ganzkörperextrakt und dann im Folgejahr mit einer Erhaltungsdosis behandelt wurden, konnten nach zwei Jahren bei drei von zwanzig Pferden keine Symptome mehr festgestellt werden (Anderson et al., 1996). Durch die Identifikation der relevantesten Allergene wurde es möglich, die AIT bei IBH zu verbessern (Novotny et al., 2021). Und somit konnte in dieser Studie erstmals gezeigt werden, dass die AIT ein neuer Ansatz in der kausalen Therapie der IBH sein kann.

Durch vorangegangenen Studien hatte sich bereits gezeigt, dass es bei der Anwendung der AIT bei IBH keine signifikanten Unterschiede in der Applikation der Allergene zwischen der intralymphatischen oder der subkutanen Injektion gab (Stefansdottir et al., 2022).

In einer Studie mit 18 Pferden die in Island leben, wurde untersucht, ob die Immunantwort bei einer intralymphatischen Immunisierung besser ist als bei einer subkutanen Impfung. Dafür wurden 12 der Pferde immunisiert und 6 Pferde dienten als Kontrollgruppe. 12 Pferde wurden entweder subkutan oder intralymphatisch mit drei rekombinanten *Culicoides*-Allergenen (Cul o 2P, Cul o 3 und Cul n 4) immunisiert. Dies geschah dreimal jeweils im Abstand von 4 Wochen. Zusätzlich wurden den Pferden vor jeder Impfung und nachfolgend alle 14 Tage über 20 Wochen Blut entnommen. Nach 18 Wochen wurde ein Intradermaltest durchgeführt. Die Blutuntersuchungen der Pferde zeigten, dass es nur zur Bildung IgG-Subklassen kam, hauptsächlich IgG1 und IgG4/7, begleitet von etwas IgG5,

jedoch keinem IgE. Auch der IDT fiel negativ aus, was eine Sensibilisierung gegen die Allergene wenig wahrscheinlich macht. Zudem gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Impfgruppen hinsichtlich der IgG-Antikörper- und Zytokinreaktion, was darauf hindeutet, dass die intralymphatischen Injektion keinen Vorteil zur subkutanen Injektion bei der AIT gegen IBH hat (Stefansdottir et al., 2022).

Da die subkutane Injektion weitaus einfacher durchzuführen ist und auch eine bessere Akzeptanz bei den Patientenbesitzern herrscht, wurde in unserer Studie die subkutane Applikation gewählt.

Bei einer anderen Studie in Island zeigte sich auch, dass eine Immunisierung mit rekombinanten Gnizenallergenen bei der einer Mischung aus Alum und MPLA als Adjuvant im Gegensatz zu reinem Alum verwendet wurde, die Allergen-stimulierten PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cell) signifikant mehr IFN γ und IL-10 produzierten als die PBMC von nicht geimpften Kontrollpferden (Jonsdottir et al., 2016). Dies war bei den Pferden, bei denen nur Alum verwendet wurde, nicht der Fall. In der hier vorgestellten Studie zeigte sich nicht nur in den entnommenen Blutproben eine vielversprechende Veränderung, sondern auch im klinischen Bild der teilnehmenden Pferde.

Klinisch zeigte sich anfangs der Behandlung kein großer Unterschied zwischen der IBH - und der Placebogruppe. Erst gegen Ende der Gnizensaison kam es zu einer sichtbaren Divergenz. Im darauffolgenden Jahr, dem zweiten Behandlungsjahr zeigte sich dies noch deutlicher und die AIT Gruppe wies einen niedrigeren IBH-Score auf als die Placeboruppe.

Aus der Kleintiermedizin weiß man, dass bei der AIT mehrere Behandlungen mit den Allergenen über einen längeren Zeitraum nötig ist (Dorofeeva et al., 2021; Mueller et al., 2018). Dies zeigte sich auch in dieser Studie. Im zweiten Behandlungsjahr verbesserten sich die Symptome im Scoring nach Olsen deutlicher als im ersten Behandlungsjahr.

Das Ausmaß der IBH Symptome ist abhängig vom Auftreten der *Culicoides* (BRAVERMAN, 1988; Riek, 1953). Daher muss man davon ausgehen, dass auch Klimaveränderungen Einfluss auf das Auftreten der *Culicoides* haben. Durch einen milden Winter und rasch einsetzenden Temperaturanstieg kann es bereits im März zu den ersten Symptomen kommen. Daher wäre es interessant, Insektenfallen

aufzustellen, um die Population der *Culicoides* parallel zu den Symptomen der Pferde zu untersuchen. Auch eine Dokumentation der Temperaturen und des Niederschlags würde die Aussagekraft von weiterführenden Studien erhöhen.

In den Blutproben konnte ein deutlicher Unterschied im Verlauf von IgE und IgG festgestellt werden. Im ersten Jahr stieg der IgG Spiegel gegen Cul o 8 vor allem nach der zweiten Injektion im April deutlich an und der IgE Spiegel sank im Vergleich zur Placebogruppe. Im Verlauf blieb der IgG Spiegel der AIT-Gruppe deutlich höher als der der Placebogruppe, bis zum Ende der Allergiesaison im Oktober. Hier sank der IgG Wert wieder fast auf den Spiegel der Placebogruppe ab. Im zweiten Jahr wurde nach der ersten Injektion jedoch wieder ein sofortiger Anstieg des IgG Spiegel beobachtet, was zeigt, dass es ein längeren Behandlungszeitraum bei solchen Patienten sinnvoll ist.

In Vergleich von IgG 1, IgG 4/7 und IgG 5 zeigte sich, dass vor allem IgG 1 und IgG 5 deutlicher anstiegen als IgG 4/7. Jedoch zeigten alle Unterklassen einen gleichen Verlauf – eine Zunahme nach der ersten und zweiten Injektion im März und April, dann ein stetiger Abfall und nach der 3. Injektion im Juli wieder ein kontinuierlicher Anstieg. Danach erfolgte zum Ende der Mückensaison wieder eine Abnahme. Nach der 1. Injektion im zweiten Jahr kam es bei allen Untergruppen direkt zu einem deutlicheren Anstieg des IgG Spiegels im Gegensatz zum Jahr davor.

Auch könnte man Standortwechsel und Nutzung der Pferde in die Studie mit einfließen lassen. Pferde die z.B. im Turniersport eingesetzt werden und immer wieder tageweise an anderen Höfen sind, haben dort andere Bedingungen der Umgebung. Im Gegensatz hierzu wären dann die Pferde zu betrachten, die den kompletten Untersuchungszeitraum tatsächlich am Heimathof verbringen wie z.B. Zuchtstuten.

In der Humanmedizin ist es bekannt, dass Stress Auswirkungen auf die Stärke der Dermatitissymptome hat (Schut et al., 2012). Auch konnten bei Allergikern höhere Konzentrationen von Oxytocin im Plasma vor Stress nachgewiesen werden, sowie höhere Cortisolspiegel im Speichel im Vergleich zu gesunden Menschen. Dies deutet darauf hin, dass Allergiker weniger effizient mit akutem Stress umgehen können (Glenk et al., 2020). Eine Studie mit Mäusen untersuchte die Auswirkungen von Stress bei Asthmamorbidität. In diesem Tiermodell wurde eine

allergische Entzündung der Atemwege mit einer Stressbelastung kombiniert, um so die Mechanismen zu untersuchen, die das Asthma durch Stress verschlimmern können. Es zeigte sich, dass exogener Stress die Reaktivität der Atemwege drastischer erhöhte und die Leukozyten in der BAL deutlich anstiegen, was für eine Erhöhung der Entzündungssymptome in den Atemwegen spricht (Joachim et al., 2003).

Fraglich ist, welche Auswirkungen Stress beim Pferd auf die Symptome der IBH hat. So könnten z.B. Wettkämpfe, Ortswechsel oder auch Änderungen in der Herdenzusammensetzung Stress für die Tiere bedeuten, ebenso chronische oder akute Schmerzen orthopädischer oder viszeraler Herkunft.

Bei Kleintieren hat sich der Einsatz von monoklonalen Antikörpern zur Behandlung der atopischen Dermatitis etabliert (Moyaert et al., 2017; Van Brussel et al., 2021). Bei der Behandlung der atopischen Dermatitis des Hundes spielt vor allem IL-31 eine wichtige Rolle (Gonzales et al., 2013). Dieses Pruritogen aktiviert vermutlich sensorische Neuronen durch Bindung in deren Peripherie. Diese Neuronen leiten dann das Signal des Juckreizes von der Haut an das Gehirn. Durch die Bindung von IL-31 wird eine anhaltende Entzündung aufrechterhalten (Bando et al., 2006). Lokivetmab (Cytoint®) ist ein caninisierte monoklonale Antikörper (mAB), der an lösliches IL-31 bindet und dieses neutralisiert (Michels et al., 2016). Da dieser über mehrere Wochen im Blutkreislauf verbleibt, hemmt er so über 4-8 Wochen den Juckreiz und reduziert Hautläsionen (Fleck et al., 2021; Michels et al., 2016).

Aus Kosten- und Verfügbarkeitsgründen sind jedoch monoklonale Antikörper keine Alternative für die Behandlung von allergischen Hauterkrankungen beim Pferd. Hier könnte eine Immunisierung der Pferde mit dem entsprechenden Zytokine, gebunden an ein Virus-Like-Partikel jedoch für einen ähnlichen Mechanismus sorgen, um dem Juckreiz bei Pferden mit IBH zu lindern. In einer Studie wurde bereits untersucht ob es möglich ist, Pferden, die an IBH erkrankt sind durch eine therapeutische Vaccine gegen IL-31 Linderung zu verschaffen (Olomski et al., 2020). Dafür wurde ein equines IL-31 mit einem virusähnlichen Partikel gekoppelt. Nach Injektion der Kombination kam es zu einer immunologischen Reaktion und der Produktion von Antikörpern gegen equines IL-31 mit Senkung der IL-31 Blutspiegel. In dieser Placebo-kontrollierten Doppelblind-Studie konnte nicht nur die Beteiligung von IL-31 an IBH nachgewiesen, sondern auch eine Linderung der klinischen Symptomatik erreicht werden (Olomski et al., 2020).

Das gleiche Prinzip wird bei der aktiven Immunisierung gegen IL-5 angewendet. IL-5 spielt eine zentrale Rolle für eosinophile Granulozyten, IL-5 führt zu einer Proliferation von Eosinophilen und trägt zu deren Aktivierung bei. Wenn eosinophile Granulozyten aktiviert werden, kann es zur Freisetzung sogenannter Effektormoleküle wie Histamin oder „basic major proteins“ kommen, diese lösen die Degranulation von Mastzellen und Basophilen aus, was eine Aufrechterhaltung und Verschlechterung der Symptomatik zur Folge haben kann (Fettelschoss-Gabriel et al., 2019). Solche Immunisierungen reduzieren die Symptomatik und könnten daher neben der AIT zum neuen Behandlungsansatz werden.

Die AIT ist jedoch im Gegensatz dazu die einzige kausale Therapieform. Die Auswahl der richtigen rekombinanten Allergene erhöht die Wirksamkeit dieser Therapie. Die in dieser Studie gewählten rekombinanten Allergene wurden nicht spezifisch für jedes Pferd bestimmt. Hier wurden alle Pferde mit derselben Allergenauswahl immunisiert, die Mischung bestand aus acht rekombinanten Allergenen (Cul o 1P, Cul o 2P, Cul o 3, 5, 7, 8, 9, 11) von *Culicoides obsoletus* und einem *Culicoides nubeculosus* rekombinanten Allergen (Cul n 4). Diese Allergene wurden auf Grund einer Studie ausgewählt, die mittels Protein-Microarray die Seren von 347 Pferden untersuchten. Die Pferde waren gesund oder an IBH erkrankt. Im Micro-array waren 27 rekombinante *Culicoides*-Allergene enthalten (Novotny et al., 2021). Um die AIT genauer auf den Patienten zuzuschneiden, wäre es eine Möglichkeit, den Pferden vor Therapiebeginn Blut zu entnehmen und die Seren entsprechend zu untersuchen, um zu identifizieren an welche der rekombinanten Allergene die IgE der betroffenen Pferde binden. Somit könnte man eine für jeden Studienteilnehmer exakt zugeschnittene Allergenmischung herstellen. Auch ein Intradermaltest der Studienteilnehmer mit rekombinanten Allergenen würde weitere Aufschlüsse geben. Vorab könnten so auch Pferde aus der Studie ausgeschlossen werden, die weder im IDT oder im Micro-arrays auf rekombinante Allergene reagieren. Zudem wäre es interessant, wie der IDT sich bei behandelten Pferden nach der Therapie im Vergleich zu vorher verändert.

Die hier vorgestellte Studie zeigt, dass sich die Therapie der IBH in Zukunft nicht nur auf die Vermeidung des Insektenkontakts beschränken könnte. Sowohl die AIT als auch die aktive Immunisierung gegen Zyktozine scheinen vielversprechende Alternativen zu sein. Bei der Behandlung von bereits erkrankten Pferden wurden

so bereits erste Erfolge erzielt. Auch der Leidensdruck bei Besitzer von erkrankten Pferden sollte nicht unterschätzt werden.

Es fehlen jedoch noch Studien, die sich über mehrere Jahre erstrecken und so Begleitfaktoren wie Wetter, Mückenbelastung und Ortswechsel besser einschätzen zu können. Hierbei könnte nicht nur eine optimale Allergenzusammensetzung untersucht, sondern auch die Frequenz und Dosis der Allergenextrakt-injektionen noch optimiert werden. So könnte man ein Behandlungsprotokoll festlegen, was auch für den praktizierenden Tierarzt umsetzbar ist. Idealerweise wird die AIT maßgeschneidert über vorangegangene Blutuntersuchungen und Microarrays für jeden Patienten speziell zusammengestellt. Es wird sich so auch zeigen, ob die AIT langfristig als einzige kausale Therapieform bei an IBH erkrankten Pferde erfolgreich eingesetzt werden kann.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die IBH ist eine der häufigsten Hautkrankheiten des Pferdes, die verschiedene Rassen betreffen und mit einer Prävalenz von bis zu 60% auftreten kann. Die betroffenen Pferde reagieren mit einer Typ I Allergie auf den Speichel der weiblichen Gnizen (*Culicoides*). Daher tritt das Krankheitsbild meist von Frühjahr bis Herbst auf, solange die Gnizen aktiv sind. Die Behandlung des Sommerekzems bei Pferden zielt hauptsächlich darauf ab, die Mückenexposition durch Schutzmaßnahmen wie spezielle Decken zu reduzieren sowie die Entzündung in der Haut zu hemmen. Eine Allergenimmuntherapie (AIT) mit Ganzkörperextrakten von *Culicoides* hat nur eine begrenzte Wirksamkeit.

In dieser prospektiven, doppelt verblindeten, placebo-kontrollierten Studie wurde die AIT mit einem Pool wichtiger rekombinanter *Culicoides*-Allergene durchgeführt. Der IBH-Läsionswert wurde während eines Vor- und 1. Behandlungsjahres (Mai bis Oktober) bei 17 Pferden sowie im Mai und Juli eines 2. Behandlungsjahres ermittelt. Neun Pferde wurden 3x subkutan mit einer Kombination aus neun R-Allergenen (je 20 µg/Injektion) in alum und MPLA immunisiert. Acht Pferde erhielten ein Placebo. Die Immunisierung wurde im folgenden Jahr zweimal wiederholt. Die spezifische Antikörperreaktion wurde ermittelt.

Im ersten Behandlungsjahr war der Rückgang des durchschnittlichen Läsionswerts in der AIT-Gruppe im Vergleich zur Placebogruppe signifikant größer, wobei 67 % der AIT- und 25 % der Placebopferde eine Verbesserung des durchschnittlichen IBH-Läsionswerts um >50 % erreichten. Die Reaktion auf die AIT wurde im 2. Behandlungsjahr verstärkt, als 89 % der AIT-Pferde gegenüber 14 % der Placebopferde eine solche Verbesserung zeigten ($p \leq 0,01$). Es wurden IgG-Antikörper aller Unterklassen induziert, wobei IgG4/7 die größten Unterschiede zwischen den Gruppen aufwies. Die Seren nach der AIT zeigten eine IgE-blockierende Aktivität.

Eine AIT mit nur wenigen Injektionen kleiner Mengen von R-Allergenen in alum und MPLA als Immunmodulator scheint ein vielversprechender Ansatz zur Behandlung von Insektenstichallergien zu sein.

VI. SUMMARY

IBH is one of the most common skin diseases in horses, affecting various breeds with a prevalence of up to 60%. The affected horses react with a type I allergy to the saliva of the female gnats (*Culicoides*). Therefore, the clinical picture usually occurs from spring to autumn, while the gnats are active. The treatment of summer eczema in horses is mainly aimed at reducing mosquito exposure through protective measures such as special blankets and inhibiting inflammation in the skin. Allergen immunotherapy (AIT) with whole-body extracts of *Culicoides* has only limited efficacy.

In this prospective, double-blinded, placebo-controlled study, AIT was carried out with a pool of important recombinant *Culicoides* allergens. The IBH lesion score was determined in 17 horses during a pre- and 1st year of treatment (May to October) and in May and July of a 2nd year of treatment. Nine horses were immunized 3x subcutaneously with a combination of nine R allergens (20 µg/injection each) in alum and MPLA. Eight horses received placebo. Immunization was repeated twice in the following year. The specific antibody response was determined.

In the first year of treatment, the decrease in the average lesion score was significantly greater in the AIT group compared to the placebo group, with 67% of horses treated with AIT achieving >50% improvement in the average IBH lesion score in contrast to 25% of placebo horses. The response to AIT was enhanced in the 2nd year of treatment, when 89% of AIT-treated horses showed such an improvement compared to 14% of horses treated with (p≤0.01). IgG antibodies of all subclasses were induced, with IgG4/7 showing the greatest differences between groups. Post-AIT sera showed IgE blocking activity.

AIT with only a few injections of small amounts of R-allergens in alum and MPLA as an immunomodulator appears to be a promising approach for the treatment of insect bite hypersensitivity.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- Anderson, G. S., Belton, P., Jahren, E., Lange, H., & Kleider, N. (1996). Immunotherapy Trial for Horses in British Columbia with *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) Hypersensitivity. *Journal of Medical Entomology*, 33(3), 458-466. <https://doi.org/10.1093/jmedent/33.3.458>
- Anderson, G. S., Belton, P., & Kleider, N. (1993). Hypersensitivity of Horses in British Columbia to Extracts of Native and Exotic Species of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). *Journal of Medical Entomology*, 30(4), 657-663. <https://doi.org/10.1093/jmedent/30.4.657>
- Ayllón, T., Nijhof, A. M., Weiher, W., Bauer, B., Allène, X., & Clausen, P.-H. (2014). Feeding behaviour of *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae) on cattle and sheep in northeast Germany. *Parasites & Vectors*, 7, 1-9.
- BAKER, K. P., & QUINN, P. J. (1978). A Report on Clinical Aspects and Histopathology of Sweet Itch. *Equine Veterinary Journal*, 10(4), 243-248. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1978.tb02271.x>
- Bando, T., Morikawa, Y., Komori, T., & Senba, E. (2006). Complete overlap of interleukin-31 receptor A and oncostatin M receptor beta in the adult dorsal root ganglia with distinct developmental expression patterns. *Neuroscience*, 142(4), 1263-1271. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.07.009>
- Barbet, Bevier, D., & Greiner, E. (1990). Specific immunotherapy in the treatment of *Culicoides* hypersensitive horses: a double-blind study. *Equine Veterinary Journal*, 22(4), 232-235.
- BARBET, J. L., BEVIER, D., & GREINER, E. C. (1990). Specific immunotherapy in the treatment of *Culicoides* hypersensitive horses: A double-blind study. *Equine Veterinary Journal*, 22(4), 232-235. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1990.tb04258.x>
- BASELGIA, S., DOHERR, M. G., MELLOR, P., TORSTEINSDOTTIR, S., JERMANN, T., ZURBRIGGEN, A., JUNGI, T., & MARTI, E. (2006). Evaluation of an in vitro sulphidoleukotriene release test for diagnosis of insect bite hypersensitivity in horses. *Equine Veterinary Journal*, 38(1), 40-46. <https://doi.org/https://doi.org/10.2746/042516406775374333>
- Björnsdóttir, S., Sigvaldadóttir, J., Broström, H., Langvad, B., & Sigurðsson, Á. (2006). Summer eczema in exported Icelandic horses: influence of environmental and genetic factors. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 48(1), 3. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-48-3>
- Blaskovic, M., Rosenkrantz, W., Neuber, A., Sauter-Louis, C., & Mueller, R. (2014). The effect of a spot-on formulation containing polyunsaturated fatty acids and essential oils on dogs with atopic dermatitis. *The Veterinary Journal*, 199(1), 39-43.
- BRAVERMAN, Y. (1988). Preferred landing sites of *Culicoides* species (Diptera: Ceratopogonidae) on a horse in Israel and its relevance to summer seasonal recurrent dermatitis (sweet itch). *Equine Veterinary Journal*, 20(6), 426-429. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1988.tb01566.x>
- Brunner, M. (2016). *Therapie des Sommerkezems mit Insol® Dermatophyton – eine Feldstudie*
- Coombs, R. (1962). The classification of allergic reactions underlying disease. *Clinical aspect of immunology.*, 317-337.

- Descotes, J., & Choquet-Kastylevsky, G. (2001). Gell and Coombs's classification: is it still valid? *Toxicology*, *158*(1), 43-49. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(00\)00400-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0300-483X(00)00400-5)
- Dorofeeva, Y., Shilovskiy, I., Tulaeva, I., Focke-Tejkl, M., Flicker, S., Kudlay, D., Khaitov, M., Karsonova, A., Riabova, K., & Karaulov, A. (2021). Past, present, and future of allergen immunotherapy vaccines. *Allergy*, *76*(1), 131-149.
- Eckert, J. (2008). *Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin: 112 Tabellen*. Georg Thieme Verlag.
- Eriksson, S., Grandinson, K., Fikse, W., Lindberg, L., Mikko, S., Broström, H., Frey, R., Sundquist, M., & Lindgren, G. (2008). Genetic analysis of insect bite hypersensitivity (summer eczema) in Icelandic horses. *Animal*, *2*(3), 360-365.
- Fadok, V. A., & Greiner, E. C. (1990). Equine insect hypersensitivity: skin test and biopsy results correlated with clinical data. *Equine Veterinary Journal*, *22*(4), 236-240. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1990.tb04259.x>
- Fettelschoss-Gabriel, A., Fettelschoss, V., Olomski, F., Birkmann, K., Thoms, F., Bühler, M., Kummer, M., Zeltins, A., Kündig, T. M., & Bachmann, M. F. (2019). Active vaccination against interleukin-5 as long-term treatment for insect-bite hypersensitivity in horses. *Allergy*, *74*(3), 572-582. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/all.13659>
- Fettelschoss-Gabriel, A., Fettelschoss, V., Thoms, F., Giese, C., Daniel, M., Olomski, F., Kamarachev, J., Birkmann, K., Bühler, M., Kummer, M., Zeltins, A., Marti, E., Kündig, T. M., & Bachmann, M. F. (2018). Treating insect-bite hypersensitivity in horses with active vaccination against IL-5. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *142*(4), 1194-1205.e1193. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.01.041>
- Fleck, T. J., Norris, L. R., Mahabir, S., Walters, R. R., Martinon, O., Dunham, S. A., & Gonzales, A. J. (2021). Onset and duration of action of lokivetmab in a canine model of IL-31 induced pruritus. *Vet Dermatol*, *32*(6), 681-e182. <https://doi.org/10.1111/vde.12943>
- Frey, H.-H., & Löscher, W. (2002). *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*. Enke.
- Frey, R., Bergvall, K., & Egenvall, A. (2008). Allergen-specific IgE in Icelandic horses with insect bite hypersensitivity and healthy controls, assessed by FcεR1α-based serology. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *126*(1), 102-109. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.06.010>
- Gehlen, H., Grimm, T., Müller-Klein, I., & Brunner, M. (2014). Kaufverhalten bei Pferden mit Sommerkezem—Ergebnisse einer empirischen Fragebogenstudie (Teil 2).
- Ginel, P. J., Hernández, E., Lucena, R., Blanco, B., Novales, M., & Mozos, E. (2014). Allergen-specific immunotherapy in horses with insect bite hypersensitivity: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Veterinary Dermatology*, *25*(1), 29-e10. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/vde.12092>

- Glenk, L. M., Kothgassner, O. D., Felnhofer, A., Gotovina, J., Pranger, C. L., Jensen, A. N., Mothes-Luksch, N., Goreis, A., Palme, R., & Jensen-Jarolim, E. (2020). Salivary cortisol responses to acute stress vary between allergic and healthy individuals: the role of plasma oxytocin, emotion regulation strategies, reported stress and anxiety. *Stress*, 23(3), 275-283. <https://doi.org/10.1080/10253890.2019.1675629>
- Gonzales, A. J., Humphrey, W. R., Messamore, J. E., Fleck, T. J., Fici, G. J., Shelly, J. A., Teel, J. F., Bammert, G. F., Dunham, S. A., Fuller, T. E., & McCall, R. B. (2013). Interleukin-31: its role in canine pruritus and naturally occurring canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol*, 24(1), 48-53.e11-42. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2012.01098.x>
- Gould, H. J., Sutton, B. J., Beavil, A. J., Beavil, R. L., McCloskey, N., Coker, H. A., Fear, D., & Smurthwaite, L. (2003). The Biology of IgE and the Basis of Allergic Disease. *Annual Review of Immunology*, 21(1), 579-628. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141103>
- Halldórsdóttir, S., & Larsen, H. (1991). An epidemiological study of summer eczema in Icelandic horses in Norway. *Equine Veterinary Journal*, 23(4), 296-299.
- Hamza, E., Doherr, M., Bertoni, G., Jungi, T., & Marti, E. (2007). Modulation of allergy incidence in icelandic horses is associated with a change in IL-4-producing T cells. *International archives of allergy and immunology*, 144(4), 325-337.
- Hansen, S., Otten, N. D., Birch, K., Skovgaard, K., Hopster-Iversen, C., & Fjeldborg, J. (2020). Bronchoalveolar lavage fluid cytokine, cytology and IgE allergen in horses with equine asthma. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 220, 109976. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2019.109976>
- Hellberg, W., Wilson, A. D., Mellor, P., Doherr, M. G., Torsteinsdottir, S., Zurbriggen, A., Jungi, T., & Marti, E. (2006). Equine insect bite hypersensitivity: Immunoblot analysis of IgE and IgG subclass responses to *Culicoides nubeculosus* salivary gland extract. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 113(1), 99-112. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.04.009>
- Huhmann, R. (2019). *Die topische Applikation von Omega-3-Fettsäuren, Harnstoff und Glykolsäure bei Pferden mit Culicoides-Hypersensitivität (Sommerekzem) lmu*].
- Illies, J., Andrassy, I., Andrassy, I., & Illies, J. (1978). *Limnofauna Europaea : eine Zusammenstellung aller die europäischen Binnengewässer bewohnenden mehrzelligen Tierarten mit Angaben über ihre Verbreitung und Ökologie* (2. überarbeitete und ergänzte Auflage. ed.). Gustav Fischer.
- Janeway, C., & Travers, P. (1996). *Immunobiology: The immune system in health and disease*/London, San Francisco, Philadelphia: Current Biology Ltd.
- Joachim, R. A., Quarcoo, D., Arck, P. C., Herz, U., Renz, H., & Klapp, B. F. (2003). Stress Enhances Airway Reactivity and Airway Inflammation in an Animal Model of Allergic Bronchial Asthma. *Psychosomatic Medicine*, 65(5). https://journals.lww.com/psychosomaticmedicine/fulltext/2003/09000/stress_enhances_airway_reactivity_and_airway.14.aspx
- Jóhannsson, V. (1988). The life cycles of *Simulium vittatum* Zett. in Icelandic lake-outlets: With 8 figures and 1 table in the text. *Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Verhandlungen*, 23(4), 2170-2178.

- Jonsdottir, S., Fettelschoss, V., Olomski, F., Talker, S. C., Mirkovitch, J., Rhiner, T., Birkmann, K., Thoms, F., Wagner, B., & Bachmann, M. F. (2020). Safety profile of a virus-like particle-based vaccine targeting self-protein interleukin-5 in horses. *Vaccines*, *8*(2), 213.
- Jonsdottir, S., Svansson, V., Stefansdottir, S. B., Schüpbach, G., Rhyner, C., Marti, E., & Torsteinsdottir, S. (2016). A preventive immunization approach against insect bite hypersensitivity: Intralymphatic injection with recombinant allergens in Alum or Alum and monophosphoryl lipid A. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *172*, 14-20.
- Jonsdottir, S., Torsteinsdottir, S., Svansson, V., Gudbrandsson, J., Stefansdottir, S. B., Mar Bjornsson, J., Runarsdottir, A., & Marti, E. (2021). Comparison of recombinant Culicoides allergens produced in different expression systems for IgE serology of insect bite hypersensitivity in horses of different origins. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *238*, 110289. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2021.110289>
- Jordan, V. J., Ireland, J. L., & Rendle, D. I. (2017). Does oral prednisolone treatment increase the incidence of acute laminitis? *Equine Veterinary Journal*, *49*(1), 19-25. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/evj.12565>
- Kalina, W. V., Pettigrew, H. D., & Gershwin, L. J. (2003). IgE ELISA using antisera derived from epsilon chain antigenic peptides detects allergen-specific IgE in allergic horses. *Vet Immunol Immunopathol*, *92*(3-4), 137-147. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12730014>
- Kempe, S. (2022). Kann eine AIT Asthma vorbeugen? In: Springer.
- Kleider, N., & Lees, M. J. (1984). Culicoides hypersensitivity in the horse: 15 cases in southwestern british columbia. *Can Vet J*, *25*(1), 26-32.
- Klier, J., Lindner, D., Reese, S., Mueller, R. S., & Gehlen, H. (2021). Comparison of Four Different Allergy Tests in Equine Asthma Affected Horses and Allergen Inhalation Provocation Test. *Journal of Equine Veterinary Science*, *102*, 103433. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jevs.2021.103433>
- KOLM-STARK, G., & WAGNER, R. (2002). Intradermal skin testing in Icelandic horses in Austria. *Equine Veterinary Journal*, *34*(4), 405-410. <https://doi.org/https://doi.org/10.2746/042516402776249083>
- Krebs, H. (2008). *Praxis der Eigenbluttherapie* (Vol. 5). Elsevier, Urban & Fischer.
- Kurotaki, T., Narayama, K., Arai, Y., Arai, S., Oyamada, T., Yoshikawa, H., & Yoshikawa, T. (2002). Langerhans Cells within the Follicular Epithelium and the Intradermal Sweat Duct in Equine Insect Hypersensitivity "Kasen". *Journal of Veterinary Medical Science*, *64*(6), 539-541. <https://doi.org/10.1292/jvms.64.539>
- Lange, S. (2004). *Untersuchung zur Vererbung des Sommerkezems beim Islandpferd Hannover*, Tierärztl. Hochsch., Diss., 2004].
- Langner, K. F., Darpel, K. E., Drolet, B. S., Fischer, A., Hampel, S., Heselhaus, J. E., Mellor, P. S., Mertens, P. P., & Leibold, W. (2008). Comparison of cellular and humoral immunoassays for the assessment of summer eczema in horses. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *122*(1-2), 126-137.

- Langner, K. F. A., Jarvis, D. L., Nimtz, M., Heselhaus, J. E., McHolland, L. E., Leibold, W., & Drolet, B. S. (2009). Identification, expression and characterisation of a major salivary allergen (Cul s 1) of the biting midge *Culicoides sonorensis* relevant for summer eczema in horses. *International journal for parasitology*, 39(2), 243-250. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.06.008>
- Larsen, J. N., & Løwenstein, H. (1996). Allergen nomenclature. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 97(2), 577-578. [https://doi.org/10.1016/s0091-6749\(96\)70301-9](https://doi.org/10.1016/s0091-6749(96)70301-9)
- Lebis, C., Bourdeau, P., & Marzin-Keller, F. (2002). Intradermal skin tests in equine dermatology: a study of 83 horses. *Equine Veterinary Journal*, 34(7), 666-672.
- Littlewood, J. D. (2013). Clinical manifestations of *Culicoides* hypersensitivity. *Veterinary allergy*, 287-290.
- Marti, E., Novotny, E. N., Cvitas, I., Ziegler, A., Wilson, A. D., Torsteinsdottir, S., Fettelschoss-Gabriel, A., & Jonsdottir, S. (2021). Immunopathogenesis and immunotherapy of *Culicoides* hypersensitivity in horses: an update. *Veterinary Dermatology*, 32(6), 579-e156. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/vde.13042>
- McKELVIE, J., FOSTER, A. P., CUNNINGHAM, F. M., & HAMBLIN, A. S. (1999). Characterisation of lymphocyte subpopulations in the skin and circulation of horses with sweet itch (*Culicoides* hypersensitivity). *Equine Veterinary Journal*, 31(6), 466-472. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1999.tb03852.x>
- Michels, G. M., Ramsey, D. S., Walsh, K. F., Martinon, O. M., Mahabir, S. P., Hoevers, J. D., Walters, R. R., & Dunham, S. A. (2016). A blinded, randomized, placebo-controlled, dose determination trial of lokivetmab (ZTS-00103289), a caninized, anti-canine IL-31 monoclonal antibody in client owned dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol*, 27(6), 478-e129. <https://doi.org/10.1111/vde.12376>
- Moriello, K. A., Stepien, R. L., Henik, R. A., & Wenholz, L. J. (2007). Pilot study: prevalence of positive aeroallergen reactions in 10 cats with small-airway disease without concurrent skin disease. *Veterinary Dermatology*, 18(2), 94-100.
- Moyaert, H., Van Brussel, L., Borowski, S., Escalada, M., Mahabir, S. P., Walters, R. R., & Stegemann, M. R. (2017). A blinded, randomized clinical trial evaluating the efficacy and safety of lokivetmab compared to ciclosporin in client-owned dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol*, 28(6), 593-e145. <https://doi.org/10.1111/vde.12478>
- Mueller, R. S., Jensen-Jarolim, E., Roth-Walter, F., Marti, E., Janda, J., Seida, A. A., & DeBoer, D. (2018). Allergen immunotherapy in people, dogs, cats and horses – differences, similarities and research needs. *Allergy*, 73(10), 1989-1999. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/all.13464>
- Nicolai, T., & Meigel, W. (1999). Entstehung der Allergie. *Sterry W, Ring G. Allergie: Prävention und Therapie mit modernen Antihistaminika. Georg Thieme Verlag Stuttgart ISBN: 3131051213*.
- Niederberger, V., Stübner, P., Spitzauer, S., Kraft, D., Valenta, R., Ehrenberger, K., & Horak, F. (2001). Skin test results but not serology reflect immediate type respiratory sensitivity: a study performed with recombinant allergen molecules. *Journal of Investigative Dermatology*, 117(4), 848-851.

- Noon, L. (1911). Prophylactic inoculation against hay fever. *The Lancet*, 177(4580), 1572-1573.
- Novotny, E. N., White, S. J., Wilson, A. D., Stefánsdóttir, S. B., Tijhaar, E., Jonsdóttir, S., Frey, R., Reiche, D., Rose, H., Rhyner, C., Schüpbach-Regula, G., Torsteinsdóttir, S., Alcocer, M., & Marti, E. (2021). Component-resolved microarray analysis of IgE sensitization profiles to *Culicoides* recombinant allergens in horses with insect bite hypersensitivity. *Allergy*, 76(4), 1147-1157. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/all.14556>
- Olomski, F., Fettelschoss, V., Jonsdóttir, S., Birkmann, K., Thoms, F., Marti, E., Bachmann, M. F., Kündig, T. M., & Fettelschoss-Gabriel, A. (2020). Interleukin 31 in insect bite hypersensitivity—Alleviating clinical symptoms by active vaccination against itch. *Allergy*, 75(4), 862-871. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/all.14145>
- Olsén, L., Bondesson, U., Broström, H., Olsson, U., Mazogi, B., Sundqvist, M., Tjälve, H., & Ingvast-Larsson, C. (2011). Pharmacokinetics and effects of cetirizine in horses with insect bite hypersensitivity. *The Veterinary Journal*, 187(3), 347-351. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.12.030>
- Olsén, L., Bondesson, U., Broström, H., Tjälve, H., & Ingvast-Larsson, C. (2008). Cetirizine in horses: Pharmacokinetics and pharmacodynamics following repeated oral administration. *The Veterinary Journal*, 177(2), 242-249. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.03.026>
- Peeters, L., Janssens, S., Goddeeris, B. M., De Keyser, K., Wilson, A., Kaufmann, C., Schaffartzik, A., Marti, E., & Buys, N. (2013). Evaluation of an IgE ELISA with *Culicoides* spp. extracts and recombinant salivary antigens for diagnosis of insect bite hypersensitivity in Warmblood horses. *The Veterinary Journal*, 198(1), 141-147.
- Peeters, L. M., Janssens, S., Goddeeris, B. M., De Keyser, K., Wilson, A. D., Kaufmann, C., Schaffartzik, A., Marti, E., & Buys, N. (2013). Evaluation of an IgE ELISA with *Culicoides* spp. extracts and recombinant salivary antigens for diagnosis of insect bite hypersensitivity in Warmblood horses. *The Veterinary Journal*, 198(1), 141-147. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.06.010>
- Pilsworth, R. C., & Knottenbelt, D. C. (2004). Equine insect hypersensitivity. *Equine Veterinary Education*, 16(6), 324-325. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.2042-3292.2004.tb00321.x>
- QUINN, P. J., BAKER, K. P., & MORROW, A. N. (1983). Sweet itch: Responses of clinically normal and affected horses to intradermal challenge with extracts of biting insects. *Equine Veterinary Journal*, 15(3), 266-272. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1983.tb01788.x>
- Riek, R. F. (1953). STUDIES ON ALLERGIC DERMATITIS ("QUEENSLAND ITCH") OF THE HORSE. *Australian Veterinary Journal*, 29(7), 177-184. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1953.tb13937.x>
- Russell, C., Heesom, K. J., Arthur, C., Helps, C., Mellor, P., Day, M., Torsteinsdóttir, S., Björnsdóttir, T., & Wilson, A. (2009). Identification and isolation of cDNA clones encoding the abundant secreted proteins in the saliva proteome of *Culicoides nubeculosus*. *Insect molecular biology*, 18(3), 383-393.
- Schaffartzik, A., Hamza, E., Janda, J., Cramer, R., Marti, E., & Rhyner, C. (2012). Equine insect bite hypersensitivity: What do we know? *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 147(3), 113-126. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.03.017>

- Schaffartzik, A., Marti, E., Cramer, R., & Rhyner, C. (2010). Cloning, production and characterization of antigen 5 like proteins from *Simulium vittatum* and *Culicoides nubeculosus*, the first cross-reactive allergen associated with equine insect bite hypersensitivity. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *137*(1-2), 76-83.
- Schaffartzik, A., Marti, E., Torsteinsdottir, S., Mellor, P. S., Cramer, R., & Rhyner, C. (2011). Selective cloning, characterization, and production of the *Culicoides nubeculosus* salivary gland allergen repertoire associated with equine insect bite hypersensitivity. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *139*(2), 200-209. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2010.10.015>
- Schurink, A., van Grevenhof, E. M., Ducro, B. J., & van Arendonk, J. A. (2009). Heritability and repeatability of insect bite hypersensitivity in Dutch Shetland breeding mares. *J Anim Sci*, *87*(2), 484-490. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1129>
- Schut, C., Weik, U., Tews, N., Gieler, U., Deinzer, R., & Kupfer, J. (2012). Psychophysiological Effects of Stress Management in Patients with Atopic Dermatitis: A Randomized Controlled Trial. *Acta Dermato-Venereologica*, *93*(1), 57-61. <https://doi.org/10.2340/00015555-1415>
- Sommer-Locher, B., Endriss, V., & Fromm, E. (2012). Various Circumstances Regarding Initial Allergen Exposure and Their Influence on Development of Insect Bite Hypersensitivity in Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, *32*(3), 158-163. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jevs.2011.08.013>
- Stefansdottir, S. B., Jonsdottir, S., Kristjansdottir, H., Svansson, V., Marti, E., & Torsteinsdottir, S. (2022). Establishment of a protocol for preventive vaccination against equine insect bite hypersensitivity. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *253*, 110502. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2022.110502>
- Steidle, B. (2009). Field studies on the etiology and diagnosis of summer eczema in Icelandic horses and in addition on the monitoring of a prophylaxis and treatment with complex homeopathic drugs in combination with own blood by means of the in-vitro-tests HRT and CAST. *Field studies on the etiology and diagnosis of summer eczema in Icelandic horses and in addition on the monitoring of a prophylaxis and treatment with complex homeopathic drugs in combination with own blood by means of the in-vitro-tests HRT and CAST*.
- Tretter, S., & Mueller, R. S. (2011). The Influence of Topical Unsaturated Fatty Acids and Essential Oils on Normal and Atopic Dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association*, *47*(4), 236-240. <https://doi.org/10.5326/jaaha-ms-5607>
- Unkel, M. (1985). *Zur genetischen Fundierung des Sommerekzem bei Islandpferden* [Dissertation, Universität Bonn,
- Van Brussel, L., Moyaert, H., Escalada, M., Mahabir, S. P., & Stegemann, M. R. (2021). A masked, randomised clinical trial evaluating the efficacy and safety of lokivetmab compared to saline control in client-owned dogs with allergic dermatitis. *Vet Dermatol*, *32*(5), 477-e131. <https://doi.org/10.1111/vde.12984>

- van der Meide, N. M., Roders, N., van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M. M. S., Schaap, P. J., van Oers, M. M., Leibold, W., Savelkoul, H. F., & Tijhaar, E. (2013). Cloning and expression of candidate allergens from *Culicoides obsoletus* for diagnosis of insect bite hypersensitivity in horses. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *153*(3-4), 227-239.
- van der Meide, N. M., Savelkoul, H. F., Meulenbroeks, C., Ducro, B. J., & Tijhaar, E. (2014). Evaluation of a diagnostic ELISA for insect bite hypersensitivity in horses using recombinant *Obsoletus* complex allergens. *The Veterinary Journal*, *200*(1), 31-37.
- Van Grevenhof, M., E., DUCRO, B., HEUVEN, H. C. M., & BIJMA, P. (2007). Identification of environmental factors affecting the prevalence of insect bite hypersensitivity in Shetland ponies and Friesian horses in the Netherlands. *Equine Veterinary Journal*, *39*(1), 69-73. <https://doi.org/https://doi.org/10.2746/042516407X153020>
- VAN GREVENHOF, E. M., DUCRO, B., HEUVEN, H. C. M., & BIJMA, P. (2007). Identification of environmental factors affecting the prevalence of insect bite hypersensitivity in Shetland ponies and Friesian horses in the Netherlands. *Equine Veterinary Journal*, *39*(1), 69-73. <https://doi.org/https://doi.org/10.2746/042516407X153020>
- Wagner, B. (2009). IgE in horses: occurrence in health and disease. *Vet Immunol Immunopathol*, *132*(1), 21-30. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.09.011>
- Wagner, B., Childs, B. A., & Erb, H. N. (2008). A histamine release assay to identify sensitization to *Culicoides* allergens in horses with skin hypersensitivity. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *126*(3-4), 302-308.
- Wagner, B., Miller, W., Morgan, E., Hillegas, J., Erb, H., Leibold, W., & Antczak, D. (2006). IgE and IgG antibodies in skin allergy of the horse. *Veterinary research*, *37*(6), 813-825.
- Wagner, B., Radbruch, A., Rohwer, J., & Leibold, W. (2003). Monoclonal anti-equine IgE antibodies with specificity for different epitopes on the immunoglobulin heavy chain of native IgE. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *92*(1-2), 45-60.
- Wilson, A. D., Harwood, L., Torsteinsdottir, S., & Marti, E. (2006). Production of monoclonal antibodies specific for native equine IgE and their application to monitor total serum IgE responses in Icelandic and non-Icelandic horses with insect bite dermal hypersensitivity. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *112*(3-4), 156-170.
- Wilson, A. D., Harwood, L. J., Björnsdottir, S., Marti, E., & Day, M. J. (2001). Detection of IgG and IgE serum antibodies to *Culicoides* salivary gland antigens in horses with insect dermal hypersensitivity (sweet itch). *Equine Veterinary Journal*, *33*(7), 707-713. <https://doi.org/https://doi.org/10.2746/042516401776249363>
- Wilson, A. D., Heesom, K. J., Mawby, W. J., Mellor, P. S., & Russell, C. L. (2008). Identification of abundant proteins and potential allergens in *Culicoides nubeculosus* salivary glands. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *122*(1), 94-103. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.10.011>

VIII. DANKSAGUNG

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Ralf Müller, der von Anfang an meine Idee unterstützt hat und es ermöglicht hat, dass hieraus diese Doktorarbeit wurde. Danke, dass du daran geglaubt hast, das ich es neben meiner Vollzeitstelle schaffen kann. Und vorallem war er derjenige, der den Kontakt zu Prof. Dr. Eliane Marti hergestellt hat. Sie und Sigridur Jonsdottir hatten einen unermüdlichen Motivation und waren eine riesige Hilfe um dieses Projekt gemeinsam zu stemmen. Egal welche Hürden uns der Zoll oder diverse Paketdienstleister in den Weg gestellt haben, wir haben immer eine Lösung gefunden. Danke für eure großartige Hilfe, ohne diese wäre diese Studie nie veröffentlicht geworden!

Danke an Islandpferde Etzenberg und Islandpferdehof Menzinger, dass ihr mir eure Pferde anvertraut habt und für diese Studie zur Verfügung gestellt habt.

Ein großer Dank gilt auch der Pferdeklinik in Parsdorf, die es mir ermöglicht hat, nicht nur sämtliche Blutproben zu bearbeiten, zu lagern und mir Unterstützung zur Verfügung gestellt hat.

Ein großes Dankeschön gilt auch meinen Eltern, die mich in dieser Zeit bestmöglichst unterstützt haben. Und auch Christian, der sämtliche emotionale Hoch und Tiefs ertragen musste. Danke an meine Paten, dass ihr immer an mich geglaubt habt.

Danke Evi Graner für deine Hilfe was die Formatierung und sämtliche Computerprobleme anging.

Danke an Prof. Dr. Astrid Bienert-Zeit dich mich ermutigt hat, diese Doktorarbeit zu beenden.

Danke an Nina, Cara, Alice und Marielu für alles.