

## Staat- en maneneezeem steeds verder ontrafeld!

Staat- en maneneezeem is een veel voorkomende allergische aandoening bij paarden en pony's en veroorzaakt veel leed. De afgelopen jaren hebben onderzoekers van Wageningen University en Universiteit Utrecht met steun van technologiestichting STW, Vereniging Koepel Fokkerij en Artu Biologicals onderzoek gedaan naar meerdere aspecten van deze aandoening. De belangrijkste resultaten van het onderzoek worden toegelicht in dit artikel.

### Het project

In 2008 is een team van onderzoekers van Wageningen University en Universiteit Utrecht van start gegaan met een grootschalig onderzoek naar staat- en maneneezeem (SME). Gedurende vijf jaar hebben de onderzoekers gezamenlijk gewerkt aan het ontwikkelen van methodes om de diagnose van SME beter te kunnen stellen, om het optreden van SME bij paarden terug te dringen en om SME ook te kunnen behandelen. Daartoe is zowel genetisch als immunologisch onderzoek gedaan met medewerking van vele particuliere eigenaren van onder meer Friese paarden, IJslandse paarden en Shetland pony's. Het onderzoek werd gefinancierd door technologiestichting STW, Vereniging Koepel Fokkerij en Artu Biologicals (onderdeel van ALK-Abelló).

### De aandoening

Staat- en maneneezeem (zomereezeem) is een allergische aandoening bij paarden en pony's\* veroorzaakt door *Culicoides* insecten, beter bekend als knutten. Biten van knutten veroorzaken een hevige jeuk bij allergische paarden waardoor deze gaan schuren met alle gevolgen van dien. In de meeste gevallen verliest het paard staartharen en manen en treedt verdikking op van de huid van de manenkam en staartwortel. Daarnaast kunnen schilfers en korstjes worden waargenomen. In ernstige gevallen ontstaan open wonden en ontstekingen. Meestal worden symptomen van SME voor het eerst waargenomen rond de leeftijd van 3 à 4 jaar.



*Een pony met ernstige symptomen van staat- en maneneezeem.*

Knutten zijn slechts enkele millimeters groot. De vrouwtjes hebben bloed nodig om eitjes te maken. Knutten zijn actief gedurende het voorjaar, de zomer en het najaar, maar niet gedurende de winter. Vandaar het seizoensgebonden karakter van SME. Vrouwtjes knutten bijten de paarden met name rond zonsopgang, in mindere mate tijdens zonsopkomst en soms ook wel overdag. Het

opstallen van paarden in een dichte stal tijdens zonsopkomst en vooral ook tijdens zonsopgang of het gebruik van een speciale deken verlaagt de blootstelling aan knutten.



*Knutten (foto gemaakt onder de microscoop) – een aantal is gevuld met bloed.*

Door op deze wijze de blootstelling aan knutten drastisch te verminderen, kan de ernst van de symptomen worden verminderd. Daarnaast zijn vele producten op de markt beschikbaar die verlichting zouden kunnen geven, maar de efficiëntie hiervan is niet of slechts beperkt wetenschappelijk getest. Er bestaat nog geen middel dat echt genezing van staat- en maneneezeem bewerkstelligt.



*Een Gelders paard met eczeemdeken – een vaak toegepaste preventieve maatregel.*

Staat- en maneneezeem is een type-1 allergie. Bij een dergelijke allergie speelt een bepaald stofje van het afweersysteem, antistof immunoglobuline E (IgE), een belangrijke rol. Dit IgE speelt een hele nuttige rol bij de bescherming tegen bepaalde parasieten, maar speelt een vervelende rol in allergieën. Een paard dat gevoelig is voor SME, zal tegen bepaalde eiwitten uit het speeksel van

\*Staat- en maneneezeem is een aandoening die zowel in paarden als in pony's wordt waargenomen. Wanneer in het artikel wordt verwezen naar paarden, is de informatie ook van toepassing op pony's.

knutten de IgE antistof aanmaken. Dit IgE gaat zich hechten aan bepaalde cellen van het afweersysteem die onder andere in de huid van het paard voorkomen. Als een paard opnieuw door een knut wordt gestoken, en de eiwitten in het speeksel van de knut door het IgE worden herkend, zal de cel hierop reageren door open te barsten. Hierdoor komt het stofje histamine vrij. Het histamine zal dan het afweersysteem alarmeren. Als gevolg hiervan ontstaat er een lokale ontstekingsreactie die gepaard gaat met zwelling en vooral veel jeuk.

Staart- en maneneceem is een multifactoriële aandoening. Zowel factoren uit de omgeving als kenmerken van een paard zelf (bijvoorbeeld leeftijd en genetische aanleg) bepalen of het paard symptomen van SME ontwikkelt nadat het is gebeten door knutten. Wanneer er geen knutten zijn, dan zal een paard met aanleg voor SME geen symptomen ontwikkelen.

## RESULTATEN GENETISCH ONDERZOEK

### Komt SME veel voor en is het erfelijk?

SME gegevens (inclusief afstamming) van ruim 6.000 Shetland pony's en bijna 3.500 Friese paarden werden verzameld door inspecteurs en paspoortconsulenten. Ook werden via een enquête SME gegevens verzameld over bijna 250 Gelderse paarden. SME symptomen werden waargenomen in 18,2% van de Friese paarden, in 7,5% van de Shetland pony's en in 11,4% van de Gelderse paarden. De genetische analyse van deze gegevens liet zien dat het krijgen van SME deels erfelijk bepaald is: de aanleg voor SME bij Shetland pony's en Friese paarden wordt voor ongeveer 20% bepaald door erfelijke factoren. Geen enkele andere factor, naast blootstelling aan knutten, heeft een dergelijk grote invloed.



*Bij 18,2% van de onderzochte Friese paarden werden symptomen van SME waargenomen.*

Het voorkomen van SME in IJslandse paarden in Nederland is niet onderzocht, hoewel eigenaren van 146 IJslandse paarden hebben bijgedragen aan het eerste DNA onderzoek. Een Zweedse studie, vergelijkbaar aan die in het project, met 1.250 IJslandse paarden geboren in Zweden liet zien dat 8,1% van de IJslandse paarden SME had. De genetische component had dezelfde orde van grootte als in Shetland pony's en Friese paarden in Nederland.

## Factoren van invloed op SME

Verdere analyse van de gegevens liet zien dat bij Shetland pony's en Friese paarden het percentage paarden met SME significant verhoogd was in bepaalde regio's binnen Nederland zoals Gelderland en Noord-Brabant, en op bepaalde momenten (maanden en jaren). De verschillen tussen regio's en tijdstippen hebben hoogstwaarschijnlijk te maken met de mate waarin knutten aanwezig zijn. In de Shetland pony's was het percentage pony's met SME het grootst in midden en grote maat pony's en in pony's met zwarte en zwartbonte vachtkleur. Pony's met een bepaalde vachtkleur zouden meer aantrekkelijk kunnen zijn voor knutten, maar resultaten van verschillende studies met betrekking tot SME en vachtkleur zijn niet eenduidig. Verder werd er in Shetland pony's met overgewicht vaker SME geobserveerd.



*De lokale habitat speelt een rol bij het voorkomen van SME: in of nabij beboste gebieden werd meer SME geobserveerd dan aan de kust.*

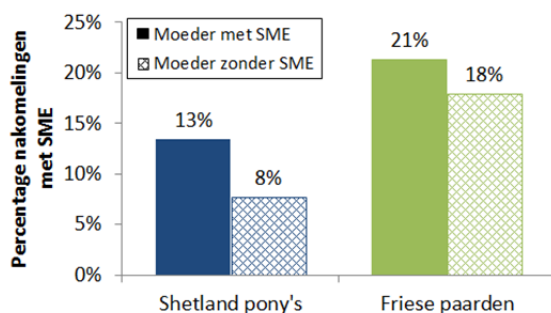
Informatie over 794 paarden van verschillende rassen, verkregen via een enquête uitgevoerd in 2008, werd geanalyseerd en liet overeenkomstige resultaten zien: regio (en lokale habitat, de natuurlijke omgeving), seizoen en ras zijn factoren die een rol spelen bij het optreden van SME. Daarnaast is er een effect van leeftijd op SME gevonden, SME werd vaker gezien bij oudere paarden. Echter, het effect van leeftijd op SME was niet eenduidig in de onderzochte Shetland pony's en Friese paarden. Het management van het paard (het opstallen, het type strooisel in de stal en het gebruik van het paard) bleek ook van invloed te zijn op het al dan niet voorkomen van SME. De resultaten geven aan dat eigenaren paarden met SME vaak opstallen om blootstelling aan knutten te verminderen. SME kwam minder vaak voor bij paarden die op stro werden gehouden of geen strooisel in hun stal hadden (bijvoorbeeld rubber matten). SME kwam vaker voor in fokpaarden (1,4x) dan in paarden die werden uitgebracht op wedstrijden.

Wanneer we de genetische aanleg van een paard voor SME willen schatten (dat is, een fokwaarde), is het van belang om rekening te houden met alle andere factoren die van invloed zijn op het voorkomen van SME!

### De overerving van SME: complex!

De aanleg voor SME is dus een erfelijk kenmerk. Echter, de overerving van deze aanleg van ouders op nakomeling is complex en wordt niet bepaald door één enkel gen, maar door een samenspel van

meerdere genen. Bij een aandoening veroorzaakt door één enkel gen, zoals SCID (een ernstige afwijking aan het afweersysteem in sommige veulens met Arabisch bloed, waardoor het veulen vaak sterft kort na de geboorte), is het mogelijk om op basis van de aan- of afwezigheid van de aandoening in ouders de kans te berekenen dat een nakomeling de aandoening zal krijgen. Voor SME is dit moeilijk, aangezien SME wordt veroorzaakt door een samenspel van meerdere genen en omdat ook andere (niet-genetische) factoren bijdragen. Echter, het onderzoek aan zowel Friese paarden als Shetland pony's liet zien dat het percentage nakomelingen met SME hoger was, wanneer de moeder ook symptomen had (zie grafiek). Het percentage nakomelingen met symptomen van SME varieerde per vader (met minimaal 20 nakomelingen) in beide rassen van 0 tot 35%.



Het percentage nakomelingen met symptomen in Shetland pony's en Friese paarden voor moeders met en zonder staart- en maneneceem (SME).

### Het eerste DNA onderzoek

Erfelijkheid speelt dus een rol bij het optreden van SME. Maar, het is niet bekend welke stukjes (genen) van het erfelijk materiaal (het DNA) bijdragen aan deze aanleg voor SME. Het vinden van deze genen zal de kennis over de oorzaken van SME vergroten. Daarmee zou ook de selectie ter vermindering van SME efficiënter gemaakt kunnen worden.

Voor het DNA onderzoek is bloed verzameld van 103 Shetland pony's en 73 IJslandse paarden met symptomen van SME en 97 Shetland pony's en 73 IJslandse paarden zonder symptomen van SME ondanks blootstelling aan knutten. Het DNA van de pony's en paarden met en zonder symptomen werd vergeleken. Daarbij zijn een aantal stukjes DNA geïdentificeerd op chromosoom 3, 7, 11, 20 en 23 die een rol lijken te spelen bij de aanleg voor SME. Het in dit project uitgevoerde DNA onderzoek is een eerste stap om de genetische component van SME op DNA niveau te ontrafelen. Het DNA onderzoek van deze complexe aandoening zal voortgezet worden in het Europese project genaamd HORSEGENE.

### Een fokstrategie?

Om te onderzoeken hoe we met behulp van fokkerij en selectie het snelst SME kunnen verminderen, zijn verschillende scenario's via modelstudies op de computer doorgerekend waarbij selectiebeslissingen werden gebaseerd op "SME gescoord aan het paard zelf" (aan- of afwezigheid van SME symptomen), op "SME scores" van nakomelingen of op DNA informatie.

De berekeningen lieten zien dat selectie met behulp van DNA informatie het aantal paarden met SME het snelst kan verminderen. Maar, een aanzienlijke investering (in tijd en vooral geld) is nodig voordat selectie met behulp van DNA informatie in een fokprogramma ingevoerd kan worden. Selectie op basis van SME symptomen zou moeten worden gebaseerd op observaties aan minimaal 10, maar bij voorkeur 20 of meer, nakomelingen. Wanneer er een strenge selectie in de dekhengsten plaatsvindt, zal het percentage paarden met SME met circa 3% per generatie kunnen verminderen.

## RESULTATEN IMMUNOLOGISCH ONDERZOEK

### Diagnostiek

Bij de aanvang van het project was er nog geen betrouwbare diagnostische test beschikbaar om SME in het laboratorium te kunnen vaststellen. Een belangrijke doelstelling was dan ook om een dergelijke test te ontwikkelen die bij voorkeur ook in de winter, wanneer de knutten afwezig zijn, aangeeft of een paard allergisch is. Daarmee kan de koper van een paard meer zekerheid krijgen dat een paard met een mooie staart en manen in de winter, ook in de zomer vrij blijft van SME klachten.

In verschillende landen hebben onderzoekers gewerkt aan het vinden van de speekselvittens afkomstig van de knutten die SME veroorzaken. Voor deze onderzoeken werden vaak twee knuttensoorten gebruikt die makkelijk in het laboratorium te kweken zijn: *Culicoides sonorensis* en *Culicoides nubeculosus*. Maar uit verschillende onderzoeken in Nederland blijkt dat bijna alle knutten die in Nederland direct van paarden gevangen worden, behoren tot de *Culicoides obsoletus* familie. De focus van het project lag daarom op deze knuttensoort. Uit verschillende experimenten kwam naar voren dat IgE van paarden met SME veel sterker reageerde op een eiwitextract van deze *C. obsoletus* dan op een extract van de twee andere knuttensoorten. Met een eiwitextract van *C. obsoletus* is vervolgens een bloedtest ontwikkeld waarmee voor 9 van de 10 paarden die de allergie hebben, dit kan worden aangetoond.



De knutten gebruikt in het onderzoek werden één voor één gevangen op een paard.

Helaas is het nog steeds niet mogelijk om *C. obsoletus* te kweken, wat het lastig maakt om aan voldoende materiaal te komen voor het uitvoeren

van een goede diagnostische test. De *C. obsoletus* gebruikt in het onderzoek werden één voor één gevangen op een paard. Om deze reden, en ook met het oog op de ontwikkeling van een therapie tegen SME, werd specifiek gezocht naar de eiwitten (allergenen) in het speeksel van *C. obsoletus*. In totaal konden 8 van dit soort allergenen geïdentificeerd worden. Deze allergenen zijn vervolgens in het laboratorium nageemaakt en deze kunstmatig geproduceerde allergenen bleken na injecteren in de huid van paarden met SME een lokale allergische reactie teweeg te brengen, wat bevestigde dat dit echte allergenen zijn. Op grond van deze allergenen is een diagnostische test ontwikkeld waarmee voor 9 van de 10 paarden die de allergie hebben, dit kan worden aangetoond. Deze kunstmatig geproduceerde allergenen zijn dus even goed voor diagnostiek als een totaal eiwitextract van op paarden gevangen knutten. Het voordeel van de kunstmatig geproduceerde allergenen is echter dat ze onbepaald in het laboratorium gemaakt kunnen worden en er dus geen knutten meer hoeven te worden gevangen. De test met deze eiwitten zal in de toekomst door Artu Biologicals (onderdeel van ALK-Abelló) op de markt worden gebracht.



*De injectie van de kunstmatig geproduceerde allergenen in de huid van paarden met SME bracht een allergische reactie teweeg.*

De ontwikkelde diagnostische test gebaseerd op 3 recombinant allergenen is ook in staat om SME buiten het knuttenseizoen (in de winter) vast te stellen. De kunstmatig geproduceerde allergenen bieden ook kansen voor het ontwikkelen van een immunotherapie tegen SME. Bij een dergelijke therapie worden paarden door middel van herhaaldelijk toedienen van de allergenen in toenemende dosis minder gevoelig gemaakt.

#### **Een beter begrip van SME**

Om tot een effectieve therapie voor SME te kunnen komen, is meer inzicht nodig in de rol die het afweermechanisme speelt in de ontwikkeling van SME. Daarom is er gekeken naar de reacties van de huid bij pony's met en zonder SME door kleine stukjes huid (4 millimeter biopten) onder de microscoop en op eiwitexpressie te vergelijken. Hierbij werd duidelijk dat er zowel bij paarden met als bij paarden zonder SME in de zomer een activering van het afweersysteem optreedt. Deze activering maakt het moeilijker om de specifieke reactie van de paarden met SME goed te kunnen onderscheiden van de gezonde paarden.

In de winter, wanneer symptomen afwezig zijn, zijn de kunstmatig geproduceerde allergenen in de huid van pony's met en zonder SME geïnjecteerd. Vervolgens werd in de kleine stukjes huid (biopten) de afweerreactie van pony's met en zonder SME vergeleken. De afweerreactie in de huid van pony's met SME liet een klassiek patroon geassocieerd met allergieën zien die lijkt op de reactie van het afweersysteem tegen parasieten. Ook in gezonde pony's vindt er een duidelijke afweerreactie plaats tegen het allergeen. Maar, de afweerreactie in de gezonde pony's is een ander soort reactie die deze pony's juist beschermt tegen het ontwikkelen van SME symptomen.

Ook is er gedurende de zomer bloed verzameld van pony's met en zonder SME. Uit dit bloed zijn afweercellen gehaald en vervolgens gekweekt in aanwezigheid van de kunstmatig geproduceerde allergenen. De afweercellen van zowel de gezonde pony's als de pony's met SME bleken specifiek op deze allergenen te reageren. Dit is een extra bevestiging dat deze allergenen van belang zijn bij zowel de allergische reactie van pony's met SME als ook de "gezonde" afweerreactie van pony's zonder symptomen. Dit biedt hoop voor het gebruik van de allergenen in een immunotherapie. De allergenen worden dan samen met hulpstoffen toegediend om het afweersysteem te "leren" om minder heftig op de allergenen te reageren.



*De ontwikkelde diagnostische test kan ook in de winter SME vaststellen, wanneer symptomen afwezig zijn.*

Bij mensen met psoriasis (een huidaandoening die gepaard gaat met hevige jeuk) wordt met redelijk succes ultraviolet (uv) B-licht therapie toegepast. Door deze uv B-licht therapie ontstaan bepaalde veranderingen in het afweersysteem in de huid waardoor deze minder overgevoelig reageert. Er is daarom een eerste, verkennende studie uitgevoerd om te onderzoeken of een uv B-licht therapie ook geschikt zou kunnen zijn voor de behandeling van SME en of hier vergelijkbare mechanismen achter liggen als bij de mens. Daartoe zijn 6 pony's op een aantal plekjes op de huid preventief behandeld door de huid gedurende een paar seconden te bestralen met uv B-licht op 4 achtereenvolgende dagen (4 behandelingen in totaal). Alle plekjes die waren behandeld, en een aantal onbehandelde plekjes, zijn geïnjecteerd met speeksel-eiwitten afkomstig van de knutten. De zwelling die gevormd werd door de allergenen op de met uv B-licht behandelde plekjes leek iets minder te zijn dan de zwelling op de onbehandelde plekjes. Na de

toegepaste uv B-licht therapie in deze 6 pony's werd er helaas geen verschil gevonden in de afweerreactie in de behandelde en onbehandelde huid. Mensen met psoriasis krijgen gemiddeld 25 tot 30 behandelingen voordat er een verbetering wordt waargenomen. Om te kunnen bepalen of uv B-licht therapie geschikt zou zijn om SME in paarden te behandelen, moet er dus verder onderzoek worden gedaan gedurende langere periodes.

### **Het vervolg**

Het genetische onderzoek naar SME wordt voortgezet in verschillende paardenrassen in een onlangs door de Europese Commissie (FP7) goedgekeurd project (voor MKB) genaamd 'HORSEGENE: Genomic tools for breeding against heritable diseases in horses'. Meer informatie over dit project dat als doel heeft de genetische achtergrond van SME, osteochondrose en chronisch progressief lymfoedeem te ontrafelen, is te vinden op [www.horsegene.eu](http://www.horsegene.eu).

Er wordt ook gewerkt aan het opzetten van een vervolgonderzoek waarbij onderzocht zal worden of paarden met SME gedesensibiliseerd (= ongevoelig gemaakt) kunnen worden door een behandeling met de kunstmatig geproduceerde allergenen. Dit zal op een vergelijkbare manier gebeuren als desensibilisatiekuren voor mensen met allergieën.

### **Meer informatie?**

De resultaten van het onderzoek zijn gepubliceerd in wetenschappelijke artikelen. Het merendeel van deze artikelen is gebundeld in de proefschriften van de drie promovenda. Het proefschrift van Anouk Schurink getiteld 'Insect bite hypersensitivity in horses: genetic and epidemiological analysis' is te downloaden van <http://edepot.wur.nl/239225>. Het proefschrift van Nathalie van der Meide getiteld '*Culicoides obsoletus* allergens for diagnosis of insect bite hypersensitivity in horses' is te downloaden van <http://edepot.wur.nl/272117>. De derde promovenda in dit project, Chantal Meulenbroeks, bevindt zich momenteel in de afrondende fase van haar promotietraject.

Voor vragen of opmerkingen kunt U via e-mail contact opnemen met de betrokken onderzoekers: [Anouk3.Schurink@wur.nl](mailto:Anouk3.Schurink@wur.nl) (voor algemene vragen en vragen over genetica), [Edwin.Tijhaar@wur.nl](mailto:Edwin.Tijhaar@wur.nl) en [C\\_meulenbroeks@hotmail.com](mailto:C_meulenbroeks@hotmail.com) (voor vragen over immunologie).

### **Auteurs en verspreiding**

Dit artikel is tot stand gekomen met medewerking van Anouk Schurink, Edwin Tijhaar, Marianne Sloet, Klaas Frankena, Chantal Meulenbroeks, Nathalie van der Meide en Bart Ducro.

Het onderzoek werd gefinancierd door technologiestichting STW, Vereniging Koepel Fokkerij en Artu Biologicals (onderdeel van ALK-Abelló). Het onderzoek is uitgevoerd door onderzoekers van het departement Infectieziekten en Immunologie en het departement Gezondheidszorg Paard van de faculteit Diergeneeskunde van de Universiteit Utrecht, en door onderzoekers van de leerstoelgroepen Fokkerij en Genetica, Celbiologie en Immunologie, en Kwantitatieve Veterinaire Epidemiologie van het departement Dierwetenschappen van Wageningen

University, met medewerking van studenten en vele privé eigenaren van pony's en paarden van diverse rassen.

Kopiëren en verspreiden van de informatie in dit artikel, inclusief afbeeldingen, is alleen toegestaan met correcte bronvermelding.