

Equine Influenza – Vergleichende Untersuchungen zu Impfungen und serologischen Ergebnissen an 636 Pferden im Zeitraum 2013–2017

Peter Thein¹, Michael Düe², Albert Röhm³ und Henrike Lagershausen²

¹ Vet. Med. Fakultät der Ludwig Maximilians Universität München

² Deutsche Reiterliche Vereinigung, 48231 Warendorf

³ Haupt- und Landgestüt Marbach a.d. Lauter

Zusammenfassung: Entsprechend dem seit 1999 gültigen Regelwerk der Deutschen Reiterlichen Vereinigung (FN) müssen alle an Wettbewerben teilnehmenden Pferde gegen Influenza nach einer Grundimmunisierung, bestehend aus drei Impfungen (V1 bis V3), im Abstand von 6 Monaten (+ maximal 21 Tage) revakziniert werden, um an Sportveranstaltungen teilnehmen zu können. Nationale und internationale Rennsportvereinigungen sowie die Internationale Vereinigungen (FEI) haben gleich – oder annähernd gleich lautende Impfverpflichtungen erlassen. Das Internationale Tierseuchenamt (O.I.E.) beschloss zu diesen Impfungen nur noch Influenza-A-equi2 (H3|N8)-haltige Vakzinen zu verwenden, bei gleichzeitiger Empfehlung, die jeweils aktuell im Hämagglutinin- Gen gedrifteten Virusstämme in diese Impfstoffe aufzunehmen. Eine Erfassung der belastbaren, d.h. protektiven Immunitätslage eines Pferdes gegenüber Influenza muss auf dem Schutz vor klinischer Manifestation und Virusausscheidung beruhen, wirklich geeignete Labormethoden dazu existieren nicht. Als Maß für den Schutz vor klinischer Manifestation werden bei der Untersuchung von Seren auf Antikörper in der Einfachen Radialen Hämolys (SRH) ermittelte Hämolysenhöfe von $\geq 85 \text{ mm}^2$ und zusätzlichem Schutz vor Virusausscheidung von $\geq 150 \text{ mm}^2$ angegeben. Die dafür in der Hämagglutinations Hemmungsreaktion (HAH), die ebenfalls zur Ermittlung protektiver Antikörpertiter eingesetzt wird, gegen H3|N8-Influenza von der WHO vorgeschlagenen Titer liegen im Bereich 1:40; gegen Influenza A1-(H7|N7) gibt es keine vergleichbaren, aktuellen Vorschläge, da diese Viren seit Jahrzehnten beim Pferd nicht mehr nachgewiesen wurden. Die Relativität der angegebenen Titer zum Immunschutz besteht darin, dass schon geringste Abweichungen im HA-Gen gedrifteter H3|N8-Viren unbekannte, andere Titer, wenn überhaupt, erfordern und dass die serologische Ermittlung der sog. Schutztiter von den verwendeten Testbedingungen des jeweils ermittelnden Labors beeinflusst ist. Dazu gehören die technischen Einzelheiten der Testdurchführung sowie die im Test jeweils eingesetzten H3|N8-Antigene. Letztendlich bewirkt die Impfung nicht die gleiche Immunitätsform wie die Infektion. Zum einen zur Verifizierung des Antikörperstatus, zum anderen wegen des Vergleichs der in verschiedenen Labors ermittelten Antikörpertiter in HAH und teilweise SRH wurden insgesamt Seren von 636 Pferden untersucht. Diese rekrutierten sich aus 73 Pferden des Bundeschampionats 2013, 473 Turnierpferden aus dem gesamten Bundesgebiet 2014 und 90 Pferden eines Turnierstalles (Betrieb K) sowie des Haupt- und Landgestüts Marbach (Betrieb M). Von allen Pferden lagen die Pferdepässe zur Auswertung der durchgeführten Impfungen und der dazu verwendeten Impfstoffe vor. Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der FN durchgeführt. Alle Seren wurden in der HAH gegen H7|N7- und H3|N8-Antigene untersucht, die der Championatspferde und der Betriebe K und M darüber hinaus in der SRH gegen beide Influenzasubtypen. Die aus diesen Untersuchungen insgesamt vorliegenden 2104 serologischen Befunde wurden unter folgenden Gesichtspunkten im Laborvergleich ausgewertet. 1. Ermittlung und Vergleich der in der HAH nachgewiesenen Antikörpertiter sowie deren prozentuale Anteile. Hierbei ergaben sich innerhalb des Laborvergleichs bereits Unterschiede. 2. Das gleiche gilt für die in der HAH und SRH eingesetzten Testantigene bezüglich der durch diese ermittelten Titer resp. Messwerte. 3. Diese z.T. signifikanten Titerunterschiede an Seren vergleichend untersuchter Pferde schlugen sich in deren, bestimmten Impfgruppen zugeordneten individuellen Titern nieder. Die individuellen Minimal- und Maximaltitern differieren stark innerhalb der Impfgruppen, die errechneten Mittelwerte der Titer dieser Pferde egalisierten dies weitgehend. 4. Die zeitliche Differenz der letzten Impfung zur Blutentnahme (3–9 Monate) hatte keinen Einfluss auf Titerhöhe und Persistenz der Antikörper. 5. Es ergab sich keine Korrelation zwischen den von beiden Labors ermittelten serologischen Ergebnissen, ebenso wie denen zwischen der HAH und SRH und den verwendeten Testantigenen. 6. Aus diesen Ergebnissen resultierten unterschiedliche Prozentsätze per definitionem immungeschützter Pferde, wenn man diesen die O.I.E. relevanten SRH-Werte von $\geq 150 \text{ mm}^2$ bei den H3|N8-Untersuchungen mit den in der HAH ermittelten Titern von $\geq 1:64$ zu Grunde legt. 7. Ein hoher Prozentsatz der untersuchten Seren wies gegenüber H7|N7-Antigen Antikörper mit z. T. hohen Titern auf. Dieser Prozentsatz lag über dem der mit A1-haltigen Impfstoffen geimpften Pferde und betraf auch junge Pferde, die nie A1-haltige Impfstoffe erhalten hatten. 8. Diese Ermittlung war möglich, da über die Prüfung der eingesetzten Impfstoffchargen in Verbindung mit den dokumentierten, diesbezüglichen Impfungen ab der Grundimmunisierung (V1 bis V3) bis V9 lückenlos der Impfstatus an 22 jungen Pferden im Vergleich zu ihrem Antikörperstatus untersucht werden konnte. Innerhalb der Auswertung ergab sich auch kein Hinweis auf die diskutierte „immunologische Lücke“ zwischen V2 und V3. Die unter den beschriebenen Gesichtspunkten vergleichend ausgewerteten Antikörperbefunde erlauben hinsichtlich der erreichten Titer keine wirklich objektivierbare Aussage in Bezug zur protektiven Impfmunität. Dafür sind die beobachtete Variationsbreite auf Basis der individuellen Antikörpertiter und deren internen Testabhängigkeiten ebenso wie die Differenzen hinsichtlich der Ergebnisse der jeweiligen Untersucher in beiden Testarten zu groß. Auf der Basis der komplexen Infektionsimmunität versus der eingeschränkten Impfmunität und diesen jeweils zu Grunde liegenden Immunmechanismen werden die erhaltenen Ergebnisse besprochen und bezüglich ihrer Relativität im Hinblick auf relevante Schlussfolgerungen in Sport und Handel bewertet.

Schlüsselwörter: Influenzaimpfung, vergleichende Serologie, HAH vs. SRH, O.I.E. Schutzwerte, Laboreinfluss, H3|N8 Drift, Protektionsraten, H7|N7-Antikörper, Immunologische Lücke, Praxisrelevanz

Equine Influenza – Comparative investigations into vaccinations and serological results in 636 horses (2013–2017)

Following the regulations of the German Equestrian Federation (FN) horses which take part in competitions have to be vaccinated against Equine Influenza. These vaccinations consist of the basic vaccinations (V1-V3) followed by revaccinations 6 month later and then in an interval of every 6 months (+3 weeks). The international rules are comparable. The World Organisation for Animal Health (O.I.E.) is responsible for recommending suitable vaccine strains for inclusions in commercial vaccines. This concerns only A2-equi-influenza (H3|N8) strains, A1-equi (H7|N7) is no longer recommended. The best protection against influenza should be protection against clinical

manifestation and virus shedding. Serological tests as measurement for these kind of immunoprotection are based on the cross-protection between vaccine strain, test antigen and circulating virus strains. The O.I.E. prefers for such tests the single radial haemolysis (SRH) with protective values of $\geq 85 \text{ mm}^2$ for clinical protection and $\geq 150 \text{ mm}^2$ for both clinical and virological protection. Beside the SRH haemagglutination inhibition (HI), based on former WHO protective titers $\geq 1:40$ (H3|N8) is an accepted serological test for the determination of an immunity level for horses. Both tests are based on antibodies against the haemagglutinin (HA) protein, a surface protein of the influenza viruses. These proteins undergo a continuous H3|N8-antigenic drift, which means that antibodies against one strain will not protect against HA of a different strain. This is also valid for the serological tests. Moreover, it's the question how p. vacc. serological titers depending on the used test antigen correlate to a protective immunity based on different forms of immunity p. inf. vs. p. vacc.. Different results from different laboratories, elaborated in their tests, may complicate the interpretation of individual antibody levels in correlation to immune protection. Sera from 636 vaccinated sport horses were collected and investigated in HI and SRH by two laboratories. Vaccination data of the horses were recorded in their Equine passports which were at our disposal. All of these sera were tested in HI- tests against H7|N7 and H3|N8-antigens, 73 sera of horses from the German championship competition 2013 additionally in the SRH and further 90 horses (2017) in both tests (stable K and stud farm M). The 2104 test results had been analysed under the following points of view: 1. Investigation of the different antibody titers (HI) and their percentage, comparing the results of the two labs. 2. On the same base the influence of the different test antigens used in HI and SRH. 3. These results showed partly significant titer differences in individual sera. The average titers of different vaccination groups equalized these differences more or less. 4. The timely difference between the last vaccinations and the bleeding of horses (3-9 months) had no remarkable influence on the persistence of antibodies and their titers. 5. The results of the two labs concerning their titers in HI and SRH and the different test antigens didn't correlate. 6. As a consequence to these different percentages of horses, tested against H3|N8 in HI vs. SRH, showed different values (percentages of protective titers). 7. More horses than vaccinated ones against H7|N7 showed antibody titers against this antigen in both tests. Even horses which had never been vaccinated with vaccines containing H7|N7 antigens. 8. 22 young horses (age classes 2011-2013) and also the used vaccines could be controlled beginning from their basic vaccinations (V1-V3) to V9. Despite of the application of vaccines without H7|N7 antigen 9 resp. 10 of them were positive in HI and/or SRH. The interpretation of the titers of these horses against H7|N7 and H3|N8 didn't show any evidence for an "immunological gap" between V2 and V3. The evaluation of the in toto analysed serological results under the described criteria comes to the conclusion of a non-existing objectivation of the individual antibody titers in relation to the immune protection of an individual horse. Too many variations are involved as the results, elaborated in two labs and their test conditions, show. This is discussed on the basis of immunity against influenza infection versus immunity post vaccination and the differences within the involved defense mechanisms and the existing possibility of their in vitro laboratory diagnostic. The consequences for acceptable tests to define "protective immunity" in horses for sport and trade are part of this.

Keywords: Flu vaccination, comparing serology, HI vs. SRH, O.I.E. protection values, laboratory influence, H3|N8 drift, rate of immunoprotection, antibodies against H7|N7, immunological gap, relevance for equine practice

Citation: Thein P, Düe M., Röhm A., Lagershausen H. (2017) Equine Influenza: Vergleichende Untersuchungen zu Impfungen und serologischen Ergebnissen an 636 Pferden im Zeitraum 2013-2017. *Pferdeheilkunde* 33, 649-663; DOI 10.21836/PEM20170608

Korrespondenz: Prof. Dr. Dr. habil. Peter Thein, Lindenstraße 2, 85250 Altomünster

Einleitung

Mit Einführung der Pflichtimpfung gegen Equine Influenza seitens der Deutschen Reiterlichen Vereinigung (FN) über deren LPO 1999 sowie entsprechenden internationalen Verpflichtungen seitens der Internationalen Vereinigung (FEI) und des Galopp- und Trainersports im halbjährlichen Abstand für alle an sportlichen Wettbewerben teilnehmenden Pferde ergab sich in Europa eine deutlich höhere Impfdichte als bis zu diesem Zeitpunkt. Herstellungsart und Antigengehalt der für diese Impfungen zur Verfügung stehenden Influenzavakzinen sind vor allem durch die genetische und antigene Drift der Influenza A equi 2-H3|N8-Virusstämme sowie deren potentieller Vorteil als Impfantigene zum Aufbau einer belastbaren Individual- wie Bestandsimmunität in laufender Diskussion. Hierbei wird über die Vakzinen der alten Generation, meist unterschiedlich adjuvierte Impfstoffe auf Basis inaktivierter H7|N7- und H3|N8-Virusanteile, im Vergleich zu nur noch H3|N8-haltigen Impfstoffen der neueren Generation – z. B. der ISCOM – und der Vektortechnik ebenso diskutiert wie über die Notwendigkeit der Inkorporation der jeweils „aktuell“ gedrifteten H3|N8-Virusstämme oder deren HA-Gen in diese Produkte (Bryant et al. 2009 und 2010, Gildea 2011, Lange 2007, Ryan et al. 2014). Letzteren Impfstoffen wird eine bessere Immunogenität und damit auch eine bessere Schutzwirkung gegenüber Produkten älterer Herstellungsart attestiert (Lange 2007, Paillot et al. 2006 und 2008). Trotz der genannten Vorschriften bleibt es jedem Anwender überlassen, welchen Impfstoff er einsetzt und ob er dies auch im

Wechsel zwischen den Produkten tut. Unbestritten ist, dass alle derzeit im Markt befindlichen Influenzavakzinen nicht in der Lage sind, eine komplexe Immunantwort im damit geimpften Pferd zu induzieren, da sie in summa nur eine gegen das jeweilige Hämagglutinin (HA) der Impfstämme gerichtete, Antikörper bedingte, humorale Impfreaktion induzieren. Dies bedeutet eine selektive p. vacc. Limitierung des stimulierten Abwehrspektrums. Dazu kommt, dass diese Impfantikörper in erster Linie den IgG-Subisotypen IgGc und IgG (T) angehören, nicht jedoch denen des Typs IgGa und IgGb, die über eine stärker virusneutralisierende Kapazität verfügen (Lange 2007, Wilson et al. 2001). Zusätzlich sind Erstimpflinge unter 1 Jahr von einem physiologischen Mangel an dem sich erst später konstituierenden IgGb betroffen. Auch das für die Kontinuität des Selbstschutzes p. inf. erforderlich immunologische Gedächtnis wird durch Impfung mit dem Typus existierender Impfstoffe nicht in der Weise induziert, wie es das Lebendvirus per Infektion oder im Lebendimpfstoff tut.

Seitens der Weltorganisation für Tiergesundheit (O.I.E.) existieren Vorgaben (O.I.E. Terrestrial Manual 2012), denen zu Folge in der Einfachen Radialen Hämolysen (SRH) getestete Seren mit einem Hämolysenhof von $\geq 85 \text{ mm}^2$ einen Schutz vor klinischer Manifestation und Hämolysenhöfe von $\geq 150 \text{ mm}^2$ einen Schutz vor Manifestation und Virusausscheidung p. inf. bedingen sollen, sprich eine Induktion protektiver Immunität gegenüber Influenza H3|N8 zur Folge hätten. Die ursprünglich von der WHO und der Europäischen Pharmakopoe vor-

gegebenen diesbezüglichen anti-HA-Titer betrugen in der HAH gegenüber Influenza-A1 -Stämmen $\geq 1:20$ und gegen A2-Stämme $\geq 1:40$. Diese HAH- Werte werden heute i. d. R. nur noch als Indiz für die Wirksamkeit innerhalb der Chargenprüfung im sog. Potencytest der Impfstoffprüfung verwendet (O.I.E. 2008). Ungeachtet dessen wird die HAH auch weiterhin zur serologischen Untersuchung von Pferden, verbunden mit der Aussage zu deren Immunitätslage eingesetzt. Die Limitierung einer quantitativen Festlegung besteht zum einen darin, dass die genannten humoralen Titer lediglich selektiv gegenüber dem jeweils im Test verwendeten Antigen und dessen HA-Struktur gerichtet sind und andererseits die in den durchgeführten Tests eingesetzten H3IN8-Antigene hierbei zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Ganz abgesehen davon, dass das jeweils kursierende, möglicherweise erneut im HA-Gen gedriftete Feldvirus noch nicht bekannt ist und somit zum Zeitpunkt serologischer Untersuchungen auch nicht getestet werden kann. Schon geringe Abweichungen im HA-Gen getesteter vs. infizierender Viren erfordern andere Titer (Daly 2002). Auf Initiative und mit Förderung der FN wurden die Seren von 636 geimpften Pferden, entnommen im Zeitraum von 2013 bis 2017, teilweise vergleichend in zwei Laboratorien in der HAH sowie der SRH untersucht. Das Ziel dieser Untersuchungen war es, den Antikörperstand an einer repräsentativen Anzahl von Pferden aus unterschiedlichen Herkunftsbeständen Deutschlands zu erfassen und die von den untersuchenden Institutionen erhaltenen Befunde hinsichtlich einer Beziehung der ermittelten Antikörperquantitäten und den eingesetzten serologischen Tests sowie einer möglichen Korrelation dieser Ergebnisse zu ermitteln. Dies vor allem auch, um über die erhaltenen Befunde deren Relevanz bezüglich eines Immunschutzes auf Basis der genannten, derzeit vorgegebenen Antikörperquantitäten zu prüfen.

Material und Methoden

Pferde

Zur Untersuchung ihres serologischen Status gegenüber Equinen Influenzaviren der Typen H7|N7 und H3|N8 wurden zunächst 73 Pferde des Bundeschampionats 2013 beprobt. Diese Proben wurden in dem als Labor 1 bezeichnetem Institut in der HAH und SRH untersucht. Es handelte sich hierbei um jüngere Pferde von 3 bis 7 Jahren. Eine weiterführende Untersuchung schloss sich 2014 an 473 Turnierpferden unterschiedlichen Alters an. Die Serumentnahmen erfolgten im Rahmen eines mit den jeweils bestandsbetreuenden Tierärzten koordinierten Programms im Zeitraum April bis Ende September 2014. Die Untersuchung dieser Seren erfolgte in der HAH im Labor 1.

Im Rahmen unserer seit Jahrzehnten durchgeführten, epizootologischen Bestandsüberwachung (Thein und Röhm 2016) wurden im Januar 2017 54 Pferde des Haupt- und Landgestüts Marbach (Bestand M) ebenfalls beprobt. Es handelte sich um 44 geimpfte Pferde unterschiedlichen Alters und 10 nicht geimpfte Jährlinge. Zum gleichen Zeitpunkt wurden von 36 Pferden eines Reitbetriebes K Proben entnommen. Unter diesen befanden sich wiederum 6 ungeimpfte Pferde. Auch hier waren unterschiedliche Altersklassen vertreten. Diese 90 Seren (M und K) wurden in der HAH in Labor 1 sowie in HAH und SRH in Labor 2 getestet.

Zu allen Pferden dieser Untersuchungen konnten über die vorliegenden Pferdepässe die durchgeführten Impfungen z.T. von Beginn der Grundimmunisierungen bis zu den letzten Impfungen vor den Blutentnahmen ausgewertet werden.

Eingesetzte Impfstoffe

Wie diesen Pferdepässen zu entnehmen, wurden alle im Handel befindlichen Impfstoffe bei den untersuchten Pferden zu unterschiedlichen Prozentsätzen eingesetzt. Eine Darstellung der aktuellen Zusammensetzung dieser Vakzinen ist in Übersicht 1 gegeben. Die entsprechend der O.I.E. Empfehlungen vorgenommenen Aktualisierungen mit jeweils aktuellen H3IN8-Antigenstämmen haben im Laufe der Jahre bei einzelnen Produkten zu entsprechenden Adaptationen geführt.

Wie aus Tab. 1 ersichtlich, wurde über den Beobachtungszeitraum zunächst das gesamte Spektrum an verfügbaren Impfstoffen eingesetzt, welches sich infolge o.a. Aktualisierungen dann auf einzelne Produkte verdichtete, wie am Beispiel der Bestände M und K in Tab. 2 dargestellt. Bezüglich ermittelter Antikörpertiter und -persistenz wurde der zeitliche Abstand zwischen letzter Impfung und Probenentnahme ermittelt. In Tab. 3 ist dies dargestellt.

Die antigene Zusammensetzung der eingesetzten Vakzinen nach Herstellerangaben:

Resequin NN plus EHV1, EHV4

Influenza-A|equi1|Prag 1|56
Influenza-A|equi2|Newmarket 1|93
Influenza-A|equi2|Newmarket 2|93

Equilis Prequenza

A|equine-2|South Africa|4|03
ab Juni 2013 A|equine-2 Newmarket|2|93

Proteq Flu

Influenza A|eq|Ohio 03 (H3/N8)
Rekombinante des Kanarienvirus
(Stamm vCP 2242)
Influenza A|eq|Richmond|1|07 (H3/N8)
Rekombinante des Kanarienvirus
(Stamm vCP 2011)

Duvaxyn IE Plus

A|equi1, Prag|1|56, inaktiviert
A|equi2, Newmarket|1|93, inaktiviert
A|equi2, Suffolk|89, inaktiviert

Equip F

A|equi1, Newmarket|77, inaktiviert
A|equi2, Kentucky|98, inaktiviert
A|equi2, Borlänge|91, inaktiviert

Serologische Untersuchungen

Soweit bekannt, wurden alle serologischen Untersuchungen gemäß O.I.E. Manual 2008 in dem jeweiligen Labor durch-

geführt. Einzelheiten bezüglich möglicher Variationen in der technischen Durchführung liegen nicht vor. Die beiden Labors verwendeten in den jeweiligen Tests die folgenden Influenza Antigene/Stämme...

Labor 1

Untersuchung der Seren der Championatspferde in HAH und SRH

H7|N7-A|equi1|Newmarket|77
H3|N8-A|equi2|Newmarket|1|93 Amerik. Linie
A|equi2|Newmarket|2|93 Europ. Linie

Untersuchung der Seren der Turnierpferde in der HAH

H7|N7-A|equi1|Newmarket|77
H3|N8-A|equi2|South Africa|4|03

Untersuchung der Seren der Bestände M und K in der HAH

H7|N7-A|equi1|Newmarket|77
H3|N8-A|equi2|Florida|1

Labor 2

Untersuchung der Seren der Bestände M und K in der HAH

H7|N7-A|equi1|Newmarket|77
H3|N8-A|equi2|Kildare|99
A|equi2|Meath|07

Untersuchung der Seren der Bestände M und K in der SRH

H7|N7-A|equi1|Prag|56
H3|N8-A|equi2|Meath|07
A|equi2|South Africa

Ergebnisse

Ausgeführte Impfungen

Von den etwa 900 am Bundeschampionat teilnehmenden Pferden wurden 73 in den Versuch genommen. Von diesen Pferden wurden die Seiten der Pferdepässe in Kopie zur Einsichtnahme zur Verfügung gestellt, die Auskünfte über die in den letzten beiden Jahren vorgenommenen Impfungen, die für die Starterlaubnis Voraussetzung sind, geben. Nur diese werden i.d.R. auch als Eingangskontrolle (Starterlaubnis) geprüft.

Eine über diese Daten hinausgehende Zurückverfolgung dieser Dokumentationen ergab, dass 41% der Pferde bis zu diesem Zeitpunkt korrekt geimpft waren, 31% mehr oder weniger, mit geringen Abweichungen korrekt und 29% mit größeren Fehlern. Die Mehrzahl der Pferde entstammte den Jahrgängen 2007 und 2008, kam aus unterschiedlichen Regionen Deutschlands und war i.d.R. von einer Mehrzahl von Tierärzten geimpft worden. Aus den Dokumenten der 2014 beprobten Turnierpferde mit vergleichbarem Hintergrund ergab sich eine ähnliche Situation. Bezüglich des Alters der Erstimpfungen der Pferde liegt die Spanne zwischen 4 Monaten und 2 Jahren mit unterschiedlichen, zeitlichen Abständen zwischen den drei Impfungen (V1–V3) der Grundimmunisierung (Tab.9).

Serologie

Der Untersuchung liegen 2104 einzelne, serologische Befunde und deren Auswertung unter verschiedenen immunologischen und praxisrelevanten Gesichtspunkten zu Grunde. Diese sind die Basis der getroffenen Aussagen; eine Einzeldarstellung dieser Befunde ist irrelevant. Im genannten Zusammenhang werden beispielhaft Einzelbefunde und im

Tab. 1 Anzahl und prozentualer Anteil der eingesetzten Vaccinen zur Impfung der vier Pferdegruppen | *Number and percentages of vaccines used within the four groups of horses*

Betrieb	Resequin Resequin NN plus	Duvaxyn IE plus	Duvaxyn IET	Equilis Prequenza	Equilis Prequenza Te	ProtecFlu Te	ProtecFlu Te	Equip F	Equip FT	Impfungen
Insgesamt eingesetzte Vaccinen	93	39	71	87	57	71	69	22	30	528
Championatspferde 2013, 73 Impflinge	17,61	5,68	13,44	16,47	10,42	13,45	13,10	4,16	5,68	100
Zur letzten Impfung vor Serumentnahme eingesetzte Impfstoffe	0	41	14	108	31	96	50	20	15	375
Turnierpferde 2014 375 Impflinge	0	10,94	3,74	28,80	8,26	25,60	13,33	5,33	4,00	100
Zur Grundimmunisierung V1, V2, V3 und letzten Impfung vor Serumentnahme eingesetzte Impfstoffe Betrieb M 2017 44 Impflinge	48	9	0	58	0	56	0	0	5	176
	27,00	5,00	0	33,00	0	32,00	0	0	3,00	100
Zur Grundimmunisierung – V1, V2, V3 und letzten Impfung vor Serumentnahme eingesetzte Impfstoffe Betrieb K 2017 30 Impflinge	33	2	3	43	6	24	3	2	4	120
	27,50	1,70	2,50	35,80	5,00	20,00	2,50	1,70	3,30	100

Übrigen summarische Ergebnisse der serologischen Untersuchungen aller Pferde dargestellt und besprochen. Die Auswertung dieser Befunde erbrachte sowohl zwischen den Ergebnissen der beiden untersuchenden Laboratorien als auch den jeweils verwendeten Testantigenen in beiden eingesetzten Tests (HAH, SRH) deutliche bis signifikante Unterschiede, auch unter Berücksichtigung der jeweils angegebenen Toleranzgrenzen der ermittelten Titer.

Die erhaltenen Ergebnisse wurden unter folgenden Aspekten analysiert und bewertet:

- Ermittelte HAH-Titer und deren Anzahl/Prozentsatz positiver Seren in dem jeweiligen Test beider Labors sowie in diesen jeweils eingesetzten H7|N7- und H3|N8-Antigenen aller untersuchten Pferde.
- Vergleich der in der HAH ermittelten Titer und deren numerischer Anteil mit den dazu vorliegenden Ergebnissen der

SRH sowie den gegenüber H3|N8 jeweils zur Untersuchung der identischen Pferde aus den Beständen M und K in beiden Labors verwendeten Antigenen.

- Errechnung der unterschiedlichen Mittelwerte der in HAH und SRH ermittelten Titer der Labors bei den in beiden Tests untersuchten Seren.
- Ermittlung des Bezuges dieser Titer zu den zu unterschiedlichen Zeitpunkten vorgenommenen, jeweils letzten Impfungen vor Serumentnahme.
- Auf Basis der vorgegebenen, protektiven O.I.E. Titer und der erhaltenen diesbezüglichen Unterschiede der jeweiligen Untersucher Errechnung der Prozentsätze der gegen H3|N8 geschützten Pferde.
- In Beziehung zu den antigenen Bestandteilen eingesetzter Vakzinen bezüglich deren H7|N7-Anteil, Darstellung der H7|N7 positiven Seren und deren prozentualen Anteil im Verhältnis zur Menge eingesetzter H7|N7-haltiger Vakzinen.

Tab. 2 Durchgeführte Vaccinationen (V1 bis V3) der Grundimmunisierung (Betriebe M und K), Alter der Erstimpflinge, zeitliche Abstände zwischen V1 bis V3 mit dazu verwendeten Impfstoffen, letzte Impfung und dazu verwendete Impfstoffe vor Probenentnahme | *Basic vaccinations (V1 – V3) of the horses (stables M and K), intervall between V1 to V3, vaccines used and last vaccinations before bleeding*

Betrieb Lfd. Pferde-Nr.	Ø Alter V1	Ø V2 p. V1	Ø V3 p. V2	V1	Verwendete Impfstoffe V2	V3	Letzte Impfung mit	Abstand letzte Impfung zu Entnahme
M1 – M10 Jahrgang 2012-2013	15 Monate	5 Wochen	7 Monate	9 x Equilis Prequenza 1x Equip FT	10 x Equilis Prequenza	10 x Equilis Prequenza	10 x ProteqFlu	6 x 3 Monate 4 x 5 Monate
M 11 – M 34 Jahrgang 1997-2013	14,5 Monate	6 Wochen	6,5 Monate	5 x Equilis Preq. 4 x Equip FT 1 x Duvaxyn IEplus 10 x Resequin 4 x ProteqFlu	9 x Equilis Preq. 1 x Duvaxyn IE Plus 10 x Resequin 4 x ProteqFlu	9xEquilis Preq. 1xDuvaxyn IE Plus 10xResequin 4xProteqFlu	24 x ProteqFlu davon 7 x ProteqFlu Te	10 x 3 Monate 14 x 5 Monate
M 45 – M 54 Jahrgang 1988-2012	16,6 Monate	7 Wochen	5,3 Monate	6 x Resequin 2 x Duvaxyn IE Plus 2 x Equilis Preq.	6 x Resequin 2 x Duvaxyn IE 2 x Equilis Preq.	6 x Resequin 2 x Duvaxyn IE 2 x Equilis Preq.	10 x ProteqFlu davon 3 x ProteqFluTe	9 x 5 Monate 1 x 6 Monate
K 1 – K 30 Jahrgang 1998 – 2012	4 Monate bis 2 Jahre	3,3 Monate	6,57 Monate	10 x Resequin 2 x Equilis Preq.Te 6 x Equilis Preq. 1 x Duvaxyn IE 1 x Duvaxyn IET 1 x Equilis Infl.NNT 2 x Equip FT 5 x ProteqFlu 1 x ProteqFlu Te	10 x Resequin 3 x Equilis Preq Te 4 x Equilis Preq 2 x Duvaxyn IET 1 x Equilis Infl.NNT 1 x Equip FT 1 x Equip F 8 x ProteqFlu	14xResequin 7xEquilis Pre 2xEquilis Preq. TE 3xProteqFlu 2xProteqFluTE 1 x Duvaxyn IE	8 x ProteqFlu 22 x Equilis Prequenza	10 x 4 Monate 1 x 6 Monate 18 x 7 Monate 1 x 9 Monate

Tab. 3 Zeitlicher Abstand der letzten Influenzaimpfung zur Serumentnahme: Zahl / Prozentsatz betroffener Pferde | *Monthly intervall between the last vaccinations and bleeding: Number / Percentages of the related horses*

Pferdegruppe	Anzahl geimpfter Pferde		1 Monat	2 Monate	3 Monate	4 Monate	5 Monate	6 Monate	7 Monate	9 Monate
Championatspferde	73	n	20	11	21	8	8	5	0	0
		%	28	14	29	11	11	7	0	0
Turnierpferde	398*	n	95	76	82	50	48	36	11	0
		%	23,86	19,09	20,60	12,56	12,06	9,04	2,76	0
Betrieb M	44	n	0	0	16	0	27	1	0	0
		%	0	0	37	0	61	2	0	0
Betrieb K	30	n	0	0	0	10	0	1	18	1
		%	0	0	0	33	0	3,35	60	3,35

* Aus den vorliegenden Impfdaten auswertbar | *evaluable vaccination data*

Tab. 4 In der HAH ermittelte Titer (n/%) der Championatspferde, Turnierpferde und Pferde der Betriebe M und K durch Labor 1 im Vergleich zu den in letzteren Betrieben -ermittelten Titern durch Labor 2 | *HI-Titer (n/%) of the championship horses, competition horses and horses of the stables M and K tested by lab 1 in comparison to the HI-Titers of the horses from M and K tested by lab 2.*

HAH Titer	Championatspferde 2013 n = 73 Labor 1						Turnierpferde 2014 n = 465 Labor 1						Betriebe M und K 2017 n = 74 Labor 1						Betriebe M und K 2017 n = 74 Labor 2					
	A1 Newmarket 1 77		A2 Newmarket 1 93 USA		A1 Newmarket 1 77		A2 South Africa 4 03		A1 Newmarket 1 77		A2 Florida 1		A1 Newmarket 1 77		A2 Kildare 99		A2 Meath 107							
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<8	14	19,10	3	4,10	20	4,30	0	0	14	18,91	0	0	16	21,62	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	1	0,20	0	0	0	0	0	0	4	5,40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	1	1,37	0	0	4	0,86	2	0,43	4	5,40	0	0	2	2,70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	4	5,48	0	0	4	0,86	2	0,43	2	2,70	0	0	5	6,76	2	3,12	0	0	0	0	0	0	0	0
64	4	5,48	0	0	12	2,85	6	1,28	3	4,05	0	0	16	21,62	16	21,62	3	4,05						
128	10	13,70	5	6,85	30	6,45	17	3,65	13	17,56	0	0	20	27,03	24	32,43	16	21,62						
256	12	16,44	22	30	101	21,70	59	12,70	24	32,43	5	6,76	7	9,46	18	24,32	27	36,49						
512	10	13,70	18	24,65	107	23	117	25,10	10	13,51	25	33,78	3	4,05	11	14,86	18	24,32						
1024	2	2,73	0	0	186	40	260	56	3	4,05	23	31,08	1	1,35	2	2,70	7	9,46						
2048*	16	22	25	34,40	0	0	2	0,42	1	1,35	19	25,67	0	0	1	1,35	3	4,05						
4096	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2,70	0	0	0	0	0	0						

* laut Laboranabe ≥ 1024

Aus den bei den untersuchten Pferden eingesetzten Impfstoffen sowie insbesondere den letzten vor den jeweiligen Serumentnahmen durchgeführten Impfungen, ergibt sich, dass allen eine m.o.w. vergleichbare Impfanamnese zu Grunde liegt. Daraus erlaubt sich der Rückschluss auf einen Vergleich der insgesamt erhaltenen serologischen Ergebnisse.

Die Differenzen innerhalb dieser sind zum einen in den in Labor 1 und Labor 2 durchgeführten Tests an sich, zum anderen in den für diese Tests jeweils verwendeten, verschiedenen Antigenen zu suchen. Auch bei identisch eingesetzten Testantigenen und Seren ergeben sich zum Teil signifikante Titerunterschiede zwischen den erhaltenen Ergebnissen der Tests des jeweiligen Labors. In Tab. 4 ist diese Situation anhand der Ergebnisse der Untersuchungen aller Pferde in der HAH dargestellt.

Von Labor 1 wurden die Seren der 73 Championatspferde und die Seren von 465 Turnierpferden in diesem Test untersucht und deren Ergebnisse aufgelistet, von Labor 1 und 2 vergleichsweise die 74 Seren der geimpften Pferde aus den Beständen M und K. Die generelle Tendenz, die aus dieser Übersicht erkennbar wird, ist, dass die Untersuchungen des Labors 1 eine signifikant höhere Anzahl von Seren mit deutlich höheren Antikörpertitern gegenüber H7|N7- und H3|N8-Antigenen ergeben als die in Labor 2 durchgeführten Tests, incl. der identischen, parallel untersuchten Seren der Pferde der Bestände M und K. Die von Labor 1 durchgeführte HAH ergibt eine deutliche quantitative Zunahme der seropositiven Seren ab Titern von 1:128 bis 1:2048. Bei den gleichen Seren erbringt die Untersuchung in Labor 2 exakt die gegenteilige Tendenz – eine quantitative Abnahme der Zahl positiver Seren mit diesem Antikörpergehalt. Gegen H7|N7- Antigen in Labor 1 untersuchte Seren dieser Pferde verfügen zu 66,00% über Titer $\geq 1:128$, in Labor 2 liegt dieser Prozentsatz bei 41,90%. Gegen H3|N8-Antigen (Stamm Florida) erbrachte die Untersuchung dieser Seren in Labor 1 kein Serum mit Titern unter 1:256, 100% befanden sich im Bereich von 1:256 bis 1:2048. In Labor 2 erbrachten

die gleichen Seren gegen H3|N8-Antigen (Stamm Kildare) positive Titer bereits ab 1:32. Im Bereich 1:256 im Gegensatz zu Labor 1 lediglich 43% positiv, gegenüber 74,30% beim H3|N8-Stamm Meath|1|07.

Dies demonstriert die Abhängigkeit der Ergebnisse zum einen von Labor zu Labor, zum anderen von den jeweils eingesetzten H3|N8-Teststämmen. Auch mit dem von Labor 1 hierzu verwendeten A2-Stamm Newmarket|1|93 Amerikanische Linie sind gegenüber dem gleichen Virus der Europäischen Linie meist höhere HAH-Titer zu verzeichnen. Von besonderem Interesse, da beide Tests, HAH und SRH, auch unabhängig voneinander mit dem Anspruch auf die Ermittlung einer individuellen, protektiven Immunität in der Praxis eingesetzt werden, ist die Untersuchung zu einer möglichen Korrelation zwischen den in diesen Tests erhaltenen Ergebnissen. Dies auch bezüglich der beschriebenen Variationsbreite innerhalb der ermittelten Resultate in der HAH. Einen direkten Vergleich in dieser Hinsicht ermöglicht die Untersuchung (Labor 1 und Labor 2) der Seren der Bestände M und K, mit denen der Championatspferde, da auch diese in HAH und SRH durchgeführt worden waren. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tab. 5 zusammengefasst.

Bei gleicher Anzahl seropositiv getesteter Pferde in beiden Labors belegen diese Ergebnisse die beschriebene Tendenz, dass bezüglich der HAH in Labor 1 gegenüber H7|N7- und H3|N8-Antigenen signifikant mehr Pferde mit hohen Antikörpertitern diagnostiziert wurden als in Labor 2. Die diesen HAH-Titern entsprechenden SRH-Ergebnisse differieren zwischen beiden Labors z.T. erheblich. In Labor 1 sind bis zu HAH-Titern von 1:128 gegen H7|N7-Antigen negative SRH-Ergebnisse zu verzeichnen. In Labor 2 dagegen können bereits ab HAH-Titern von 1:16 Seren mit SRH-Werten im unteren Schutzbereich von $\geq 80 \text{ mm}^2$ nachgewiesen werden. Ab HAH-Titern von 1:32 sind hier mit steigender Tendenz SRH-Werte bis $211,78 \text{ mm}^2$ ermittelt worden. In Labor 1 dagegen sind auch bei HAH-Titern von 1:2048 noch Seren mit SRH-Werten unter 150 mm^2 anzutreffen. Auch gegenüber H3|N8-Antigenen besteht zwischen den Ergebnissen

Tab. 5 Vergleich der Titer und Anzahl betroffener Seren in HAH und SRH der Championatspferde, getestet von Labor 1, sowie der Pferde der Betriebe M und K, getestet von Labor 2, bei Verwendung verschiedener Testantigene | *Comparison of the HI- and SRH-titers, number of sera (championate), tested by lab 1 and the respective results of the horses (stables M and K) tested by lab 2, using different antigens in the tests * ≥ 1024*

Championatspferde 2013 n = 73 Labor 1				Betriebe M und K 2017 n = 74 Labor 2							
A1 Newmarket 1 77				A2 Meath 1 07				A2 South Africa 4 03			
HAH Titer	HAH n	SRH von ... bis mm^2	SRH n	HAH Newmarket 1 77 n	SRH Prag 1 56 von ... bis mm^2	HAH Kildare 99 n	SRH Meath 1 07 von ... bis mm^2	SRH South Africa 4 03 von ... bis mm^2	HAH Meath 1 07 n	SRH Meath 1 07 von ... bis mm^2	SRH South Africa 4 03 von ... bis mm^2
<8	14	negativ	3	negativ	27,65 – 69,21	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	13,42 – 74,39	0	0	0	0	0	0
16	1	44,14	0	0	53,36 – 88,04	0	0	0	0	0	0
32	4	negativ – 61,22	0	0	83,93 – 115,60	2	124,62 – 154,19	139,99 – 160,41	0	0	0
64	4	negativ – 74,15	0	0	111,07 – 160,86	16	95,76 – 176,98	42,07 – 195,34	3	92,07 – 124,62	92,07 – 139,59
128	10	negativ – 112,29	5	73,31 – 136,81	120,60 – 179,58	24	118,57 – 197,58	105,53 – 208,57	16	108,38 – 161,42	107,37 – 171,02
256	12	72,08 – 133,26	22	95,74 – 183,31	138,34 – 211,78	18	132,36 – 206,65	125,92 – 219,22	27	113,76 – 176,98	113,70 – 195,34
512	10	120,29 – 171,93	18	139,86 – 221,54	179,82 – 203,10	11	135,85 – 226,33	137,09 – 241,45	18	135,85 – 202,09	137,09 – 212,55
1024	2	128,99 – 156,19	0	0	211,78	2	173,57 – 203,42	159,18 – 198,33	7	179,94 – 226,65	172,87 – 235,08
2048*	16	142,33 – 221,15	25	161,44 – 263,44	0	1	199,20	199,83	3	199,20 – 214,75	199,83 – 241,45

der beiden Laboratorien diese Tendenz. So sind in Labor 1 erst ab HAH-Titern von ≥ 1024 (entspricht ab 2048) alle davon betroffenen 25 Pferde im SRH-Bereich von $\geq 150 \text{ mm}^2$, die Tendenz zu diesen Werten beginnt bei HAH-Titern ab 1:256, in Labor 2 dagegen bei HAH-Titern ab 1:32, wenn diese mit dem Antigenstamm Kildare getestet wurden, ab 1:128 in der HAH gegen Stamm Meath|07.

Ableitend aus den bisher beschriebenen Ergebnissen sind in Tab. 6 die errechneten Mittelwerte der H3|N8-SRH Ergeb-

nisse der Seren der Championatspferde, getestet in Labor 1, und der Bestände M und K in Labor 2 untersucht, dargestellt. Die Anzahl der untersuchten Seren ist ebenso wie deren Impfanamnesen identisch, damit sind auch die errechneten Mittelwerte vergleichbar. Wie in dieser Tabelle dargestellt, bestätigen sich die bislang geschilderten Tendenzen. Während in Labor 1 z.B. von 73 untersuchten Pferden 25 (34%) gegen den H3|N8-Stamm Newmarket, Amerikanische Linie, mit Titern ab 2048 auffallen, sind dies bei den in Labor 2 untersuchten Seren maximal 3 Seren (H3|N8 Meath|07) und

Tab. 6 Errechnung der Mittelwerte (MW) der SRH gegenüber den eingesetzten H3|N8-Testantigen-Stämmen im Vergleich zu den jeweiligen in der HAH ermittelten H3|N8-Titern und den dort eingesetzten Antigenen sowie deren Verteilung bei den Championatspferden und den Pferden der Betriebe M und K, getestet in Labor 1 und 2 | *SRH-average values (H3|N8) obtained by different antigens and their comparison to the respective HI-titers and their testantigens within the horses tested by lab 1 and 2*

HAH positive Seren – Championatspferde 2013 Labor 1					HAH positive Seren – Betriebe M und K 2017 Labor 2						
Newmarket 1 93 Amerikanische Linie			Newmarket 2 93 Europäische Linie		Kildare/99 HAH Titer	HAH n	Meath 1 07 MW SRH mm ²	S.Africa 4 03 MW SRH mm ²	Meath 1 07 HAH n	Meath 1 07 MW SRH mm ²	S.Africa 4 03 MW SRH mm ²
HAH Titer	HAH n	MW SRH mm ²	HAH n	MW SRH mm ²							
32	0	0	0	0	32	2	139,40	150	0	0	0
64	0	0	2	74,24	64	16	124,63	127,95	3	106,99	108,99
128	5	106,51	6	112,58	128	24	149,15	153,26	16	154,32	132,31
256	21	144,42	22	134,07	256	18	165,65	167,60	27	145,06	152,01
512	18	174,59	17	172,82	512	11	169,71	172,56	18	166,21	170,04
1024	0	0	2	207,63	1024	2	188,52	178,75	7	197,15	196,33
≥1024	25	220,98	20	216,73	2048	1	199,20	199,83	3	205,81	205,81

Tab. 7 Vergleichende Ergebnisse der HAH zwischen Labor 1 und Labor 2 auf Basis der ermittelten Durchschnitts¹-Minimal- und Maximaltiters² in Beziehung zu den entsprechenden Werten der SRH bei Pferden mit unterschiedlichem zeitlichen Abstand zur letzten Influenzaimpfung (Betriebe M und K); ¹ = arithmetischer Mittelwert, ² = individueller Minimal-Maximaltiter / *Individual max- and min-HI-titers, their average values from lab 1 and lab 2 and their comparison of the SRH-values from lab 2 (stables M and K)*

74 Pferde Betriebe M und K	MW ¹ MAX ² MIN ²	Labor 1 SRH mm ²			Labor 2 HAH			Labor 1 HAH	
		A2 Meath 1 07	A2 S.Africa 4 03	A1 Prag 1 56	A1 Newmarket 1 77	A2 Kildare 99	A2 Meath 1 07	A1 nn.	A2 Florida 1
Betrieb M 16 Pferde 3 Monate p.vacc.	MW	152,55	174,69	110,25	62	168	352	143	848
	MAX	226,33	235,08	179,58	128	512	1024	512	2048
	MIN	115,03	131,14	27,65	32	64	128	16	256
27 Pferde 5 Monate p.vacc.	MW	151,56	157,85	115,21	124	171	375	348	948
	MAX	214,75	241,45	212,03	512	512	2048	1024	2048
	MIN	95,76	92,07	37,97	32	32	64	128	256
1 Pferd 5 Monate p.vacc.		148,74	142,11	13,42	8	128	256	16	1024
Betrieb K 10 Pferde 4 Monate p.vacc.	MW	158	154,60	79,22	77,60	582,40	442,50	173	1588
	MAX	199,20	199,83	160,08	256	2048	1024	256	4096
	MIN	100,59	94,38	68,26	8	64	64	64	512
19 Pferde 6-7 Monate p.vacc.	MW	154	133,75	117,63	156	269,50	391	344	1159
	MAX	203,48	198,33	211,78	1024	1024	1024	2048	4096
	MIN	108,38	107,37	48,37	8	64	128	32	512
1 Pferd 9 Monate p.vacc.		164,70	151,45	129,32	64	128	256	256	1024

1 Serum (Kildare|99), entsprechend 4 resp. 1,30%. Während die analogen SRH-Werte der in Labor 1 getesteten Seren erst mit HAH-Titern von 1:512 den protektiven SRH-Wert von $\geq 150 \text{ mm}^2$ erreichen, werden diese in Labor 2 bei einem Pferd bereits ab HAH-Titern von 1:32 (South Africa|4) erreicht, tendenziell gegen beide in der SRH getesteten Antigene ab HAH-Titern von 1:128 bei allen Pferden mit steigender Tendenz.

Im Endpunkt gleichen sich die Maximalwerte der SRH im Bereich $\geq 200 \text{ mm}^2$; allerdings ist keine Korrelation zwischen HAH und SRH bei Laborvergleich erkennbar. Auch wenn die dargestellten Mittelwerte implizieren, dass die jeweilige Titergruppe im protektiven Bereich von $\geq 150 \text{ mm}^2$ liegt, existieren innerhalb dieser Gruppen deutliche individuelle Unterschiede. Auch bei den Pferdeguppen mit HAH-Titern von 1:512 (Labor 2) kommen noch einzelne Seren mit SRH-Werten $\leq 150 \text{ mm}^2$ vor. Nachdem in der Praxis nicht durch die Ermittlung des protektiven Schutzes einer Gruppe von Pferden über deren Antikörperstatus auf Basis des Mittelwertes der Titer entschieden wird, sondern über Antikörper der einzelnen Individuen, bestehen diesbezüglich erhebliche Titterschwankungen und daraus zusätzlich eine mangelnde Korrelation.

Nicht allein die Höhe der postvazinal erreichten Antikörpertiter, gemessen in einem der gewählten serologischen Tests, sondern auch deren zeitliche Persistenz dient als Grundlage geltender Impfempfehlungen. In Tab. 7 sind die Ergebnisse der HAH beider Labors und der SRH von Labor 2 der 74 geimpften Pferde der Bestände M und K sowie die jeweils ermittelten Maximal- und Minimaltitern der einzelnen Pferde versus der sich daraus ergebenden Mittelwerte der Impfgruppen in Beziehung zum zeitlichen Abstand der vorgenommenen Impfungen dargestellt. Ebenso kann die zeitlich unterschiedliche Persistenz von Antikörpern in entsprechender Quantität nicht in direkte Beziehung zu deren Immunprotektion gesetzt werden, da kein wissenschaftlicher Maßstab dafür, vor allem aber auch nicht für Virusfreiheit des betroffenen Individuums existiert (Lange 2007). Die errechneten und in Tab. 7 dargestellten Mittelwerte der Titer aus HAH und SRH der Pferde der jeweiligen Impfgruppen mit unterschiedlichem, zeitlichem Abstand zur letzten Impfung der Betriebe M und K sind vergleichbar. Der Mittelwert der Gruppe egalisiert also die jeweils vorhandenen, individuellen Titerunterschiede der

gleichermaßen geimpften Pferde, wie die dargestellten, individuellen Maximal- und Minimalwerte der jeweiligen Impfgruppe zeigen. Dies betrifft sowohl die in der HAH wie in der SRH gegenüber H7|N7 und H3|N8 getesteten Seren. Der quantitative Unterschied der ermittelten, persistierenden Antikörper zwischen den Ergebnissen der beiden untersuchten Labors macht sich auch hierbei wieder bemerkbar, getestet an identischen Seren in der HAH. Auf Basis der Mittelwerte betragen diese beispielsweise in der Gruppe M 5 Monate p. vacc., in Labor 1, getestet gegen H3|N8|Florida 1:948, in Labor 2 dagegen, getestet gegen H3|N8|Kildare 1:171 und H3|N8|Meath 1:348. Dies drückt sich auch in entsprechenden Titern der Einzelseren mit ihren großen Unterschieden aus. Einzelne Seren diesbezüglich aufzulisten, sprengt den Rahmen dieser Publikation. Exemplarisch für diese Situation ist z.B. das Ergebnis des Pferdes Nr. M54, dessen H3|N8-Titer in Labor 1 getestet, bei 1:1024 liegt und in Labor 2 bei 1:128. Es resultiert in toto aus den vorliegenden Ergebnissen ein hoher Prozentsatz seropositiver Seren mit den dargestellten, großen Titerunterschieden in den jeweiligen Tests, diese erlauben wegen deren Variationsbreite und mangelnden Korrelation keinen objektivierbaren Rückschluss auf den real daraus abzuleitenden Immunschutz der einzelnen Pferde.

In Tab. 8 sind auf Basis des SRH-Wertes von $\geq 150 \text{ mm}^2$ als postuliertem Schutz vor klinischer Manifestation und Virusausscheidung gegenüber H3|N8-Virus die summarisch von den untersuchenden Labors in den jeweiligen Pferdeguppen ermittelten Werte (Anzahl/ Prozentsatz) erfasst und den analogen HAH-Titern von 1:64 ($\geq 1:40$) gegenübergestellt.

Diese Ergebnisse belegen die mangelnde Korrelation der insgesamt erhobenen Befunde aus den unterschiedlichen Tests. Wie ersichtlich, liegt der Prozentsatz von Seren mit den geforderten Titern in der HAH bei den von Labor 1 insgesamt untersuchten Pferden zwischen 95,83 und 100%, in der SRH untersuchte, identische Seren verfügen dagegen nur zu 56,16 resp. 64,38% über die angegebenen Werte. Von Labor 2 wurden analog die 74 Impfungen der Bestände M und K diesbezüglich ausgewertet. Hinsichtlich der Ergebnisse der HAH liegen hier die Werte zwischen 95,45 und 100%, die der SRH zwischen 50 und 61,36% mit entsprechender Abhängigkeit vom verwendeten Testantigen. Zwischen dem Antikörpergehalt von Stuten und männlichen Tieren, wie von Ryan et al.

Tab. 8 Seren (n/%) mit Schutztitern gegen H3|N8, HAH vs. SRH aller untersuchten Pferde, Ergebnisse Labor 1 und 2; angenommene Schutztitern: HAH $\geq 1:64$, SRH $\geq 150 \text{ mm}^2$ | *Sera (n/%) with protective H3|N8-titers, HI vs. SRH, of all investigated horses, results from lab 1 and lab 2. Proposed protective titers: HI $\geq 1:64$, SRH $\geq 150 \text{ mm}^2$*

Geimpfte Pferde n Betrieb	Labor 1 H3 N8 HAH n %				Labor 2 HAH n %		Labor 1 SRH n %		Labor 2 SRH n %	
	Newmarket 2 93 Europa	Newmarket 1 93 USA	S. Africa 4 03	Florida 1	Kildare 99	Meath 1 07	Newmarket 2 93 Europa	Newmarket 1 93 USA	Meath 1 07	S. Africa 4 03
73 Championats- pferde	69 95,83 %	69 95,83 %	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	41 56,16%	47 64,38%	n.u.	n.u.
458 Turnierpferde	n.u.	n.u.	458 98,50 %	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
44 Pferde Betrieb M	n.u.	n.u.	n.u.	44 100 %	42 95,45 %	44 100 %	n.u.	n.u.	22 50 %	27 61,36 %
30 Pferde Betrieb K	n.u.	n.u.	n.u.	30 100 %	30 100 %	30 100 %	n.u.	n.u.	17 56,66 %	17 56,66 %

Tab 9 V1 bis V9 junger Pferde der Jahrgänge 2011 bis 2013, geimpft mit H3|N8-haltigen Impfstoffen und unterschiedlich hohen H7|N7 Titern in HAH und SRH | V1 to V9 of young horses, ageclasses 2011 to 2013, vaccinated with H3|N8 vaccines and antibodies of different levels against H7|N7 in HI and SRH

Pferd Nr. Betrieb	Gruppe/ Jahrgang	Impfungen/ Impfstoff V1 bis V9	Nr.	Labor 1 HAH			Labor 2 HAH			Labor 2 SRH			
				A1 Newmarket 77	A2 South Africa 4 03	A1 Newmarket 77	A2 Kildare 99	A2 Meath 107	A1 Prag 56	A2 Meath 107	A1 SA 4 03		
M1 M6 bis M 10 M 11, 34 (n=8)	1 28.2.2013 bis 29.5.2013	V1	3.7.2014	Equilis Frequenza Te	M1	<8	1024	<8	128	256	neg.	169,74	178,99
		V2	8.8.2014	Equilis Frequenza Te	6	<8	2048	<8	256	512	neg.	193,37	206,91
		V3	25.2.2015	Equilis Frequenza	7	<8	2048	<8	256	512	neg.	202,09	169,44
		V4	14.9.2015	Equilis Frequenza Te	8	<8	2048	<8	256	512	neg.	172,64	191,53
		V5	1.4.2016	ProteqFlu	9	<8	256	<8	32	64	neg.	124,62	139,59
		V6	20.10.2016	ProteqFlu	10	<8	512	<8	128	128	neg.	131,65	142,11
2 M 3, 4, 5 M 12, 26 K 25 (n=6)	19.3.2012 bis 21.5.2012	V1	27.8.2013	Equilis Frequenza	M3	16	256	<8	128	128	27,65	132,87	137,71
		V2	11.10.2013	Equilis Frequenza	4	16	1024	<8	256	256	69,21	164,24	174,16
		V3	18.6.2014	Equilis Frequenza	5	16	1024	8	128	256	74,39	152,87	170,55
		V4	19.12.2014	Equilis Frequenza	12	64	2048	32	128	1024	109,28	195,35	208,57
		V5	7.2. + 3.5.2015	Equilis Frequenza	26	<8	2048	<8	512	2048	37,97	214,75	241,45
		V6	7.2. + 3.5.2016	ProteqFlu	K25	<8	2048	<8	512	512	neg.	161,54	156,95
		V7	17.8. + 12.10.2016	ProteqFlu									
M 2, 13, 14, 28 K3, 16, 24 (n=8)	3 4.3.2011 bis 7.5.2011	V1	15.8.2012	Equip FT*	M2	128	512	64	128	128	131,54	147,12	156,50
		V2	20.9.2012	Equilis Frequenza 4x Equip FT	13	128	2048	64	256	1024	140,11	206,65	219,32
		V3	25.6.2013	Equilis Frequenza	14	128	2048	64	512	1024	127,29	226,33	235,08
		V4	18.3.2014	Equilis Frequenza	27	256	1024	128	128	512	153,86	183,52	196,71
		V5	23.9.2014	Equilis Frequenza Te	28	256	512	128	128	128	154,30	153,97	172,99
		V6	25.2.2015	Equilis Frequenza Te	K3	<8	2048	<8	128	256	neg.	167,90	158,62
		V7	7.9.2015	Equilis Frequenza	16	<8	1024	<8	64	128	neg.	133,07	125,62
		V8	19.3.2016	ProteqFlu	24	<8	4096	<8	2048	2048	neg.	199,20	199,83
V9	17.8.2016	ProteqFlu											

*H7|N7-haltiger Impfstoff

(2015) beschrieben, konnten in dieser Untersuchung keine quantitativ erfassbaren Unterschiede festgestellt werden. Auf dieser letztlich wichtigsten Aussage, der Objektivierbarkeit und Sicherheit reproduzierbarer Ergebnisse der HAH und der SRH sowie des dadurch ermittelten Antikörpergehalts mit begründbarer Berechtigung zum korrelierbaren Immunschutzes des einzelnen Pferdes beruht die Testeignung. Deren Grenzen und mangelnde Objektivierbarkeit wie Korrelation belegen die erhobenen Daten. Lässt man ein Pferd im Sport oder Handel von unterschiedlichen Labors in den verschiedenen Tests untersuchen, um auf dessen Immunprotektion zu schließen, können demzufolge differente Ergebnisse zustande kommen, die gänzlich unterschiedliche Schlussfolgerungen bedingen. Auch muss auf die Variabilität der Titer durch die jeweils verwendeten Testantigene hingewiesen werden. Die von *Daly* (2002) getroffene Aussage zur Eignung der geforderten protektiven SRH-Titer werden dadurch weiter relativiert. Diese Titer haben nur dann Gültigkeit, wenn sie gegenüber den Nukleotiden des Hämagglutinins des jeweiligen H3|N8-Stammes in der SRH eingesetzt werden, der auch der infizierende, also quasi autologe ist. Schon geringste Abweichungen im HA- gedrifteter H3|N8-Viren machen eine korrekte Aussage auf Basis dieser SRH-Titer nicht mehr möglich. In den Untersuchungen fällt der hohe Anteil A1-positiver Seren der getesteten Pferde trotz der Mehrzahl eingesetzter Impfstoffe ohne H7|N7-Anteil auf. Hierfür können demzufolge nicht ausschließlich Impfungen mit bivalenten, H7|N7-Antigen-haltigen Impfstoffen ursächlich verantwortlich gemacht werden. Eine Überprüfung der dokumentierten Impfungen mit den jeweils verwendeten Vakzinen ergab, dass der Anteil A1-positiver Seren über dem der untersuchten Pferde liegt, die mit A1-haltigen Impfstoffen geimpft worden waren. Bezüglich aller in der H7|N7-HAH untersuchten Seren ergibt sich daraus die folgende Situation H7|N7-positiver Pferde:

2013	Championatspferde	81%
2016	Turnierpferde	95,5%
2017	Betriebe M und K Labor1	81%, Labor 2 78%

Die in der SRH getesteten Seren der Championatspferde und der Betriebe M und K liegen im vergleichbaren prozentualen Bereich, sie entsprechen bezüglich der erreichten Werte den gegenüber H3|N8 nachgewiesenen. Auch in der HAH gegen H7|N7 negative Seren weisen hierbei in der SRH-Werte zwischen 27,65 und 69,21 mm² auf und bei einem Titer von 1:8 wird mit 74,39 mm² in der SRH bereits knapp der untere Schutzwert von 85 mm² erreicht (Tab.9). In dieser Tabelle sind die von V1 bis V9 eingesetzten Impfstoffe (Betriebe M und K) ohne A1-Antigen sowie die Antikörpertiter der Seren der damit geimpften Pferde aufgelistet. Lediglich 2012 (V1, V2 in Gruppe 3) wurde bei einem, resp. bei fünf Pferden je 1 × eine H7|N7-haltige Vakzine verwendet. Dennoch finden sich in den Jahrgangsgruppen 2 und 3 in den Untersuchungen von Labor 1 neun A1-positive und von Labor 2 sieben A1-positive Pferde mit z. T. hohen Titern in HAH und SRH. Andere, ebenso geimpfte Pferde des gleichen Bestandes sind dagegen A1-negativ. Der ehemals A1-haltige Impfstoff Equilis Prequenza ist, wie in Übersicht 1 dargestellt, seit Juni 2013 ohne dieses Antigen im Handel. Eingesetzt und überprüft wurden nur nach diesem Datum hergestellte Chargen.

Die komplette Rückverfolgung der von V1 bis V9 durchgeführten Impfungen bis zum Zeitpunkt der Serumentnahmen

erlaubt auch einen Hinweis zu der diskutierten „Immunologischen Lücke“ zwischen den Vakzinationen 2 und 3 der Grundimmunisierung (*Gildea* 2011, *Thein* und *Röhm* 2016). Es wurde schon darauf hingewiesen, dass dies möglicherweise eher eine anwendungsbedingte, serologische – wenn überhaupt prinzipiell vorhanden – Ursache hätte. Wäre es eine grundlegend immunologische, wären Auswirkungen auf die danach folgenden Impfungen im negativen, also suppressiven Sinne zu erwarten. Die Daten der Tab. 9 der 22 geimpften, jungen Pferde belegen, dass dies nicht der Fall ist. Alle Pferde haben auf die Folgeimpfungen mit ausreichender Antikörperbildung reagiert, 81,82% erreichen in der SRH zum Entnahmezeitpunkt Werte von ≥ 150 mm². Dies ist mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit unabhängig von der Art der eingesetzten Impfstoffe, da nicht ersichtlich ist, wie ein einzelner, bestimmter Impfstoff bei der „Verhinderung“ oder „Überbrückung“ dieser sog. „Lücke“, die nicht zur Vakzine und deren Konstruktionsprinzip, sondern eher zu deren Anwendung, wie Alter der Erstimpflinge, gewählte Impfabstände usw. in Beziehung steht (*Lange* 2005, *Thein* und *Röhm* 2016), einen Vorteil haben könnte.

Diskussion

Immunität: Infektion vs. Impfung

In der Infektionsmedizin werden serologische Untersuchungen entweder zur Erhebung epidemiologisch verwertbarer Befunde oder zur Erfassung der Abwehr- resp. Immunitätslage des einzelnen Individuums eingesetzt. Im letzteren Fall gelingt dies nur, wenn die humorale Reaktion auf der Bildung von Antikörpern eines bestimmten Isotyps beruht, der spezifisch gegen in- und/oder externe, essentielle Bestandteile des jeweiligen Erregers gerichtet und zur Neutralisation von dessen Infektiosität befähigt ist. Voraussetzung dafür ist, dass der jeweils zu diesem Zweck verwendete Labortest geeignet ist, diese Reaktion zu erfassen und entsprechend zu quantifizieren. Auch im Fall der Influenza sind diesem Anspruch enge Grenzen gesetzt. Die Influenza des Pferdes verläuft als Inhalationsinfektion, gefolgt von primärer und sekundärer Virämie. Diese ist abhängig von Virulenz und Pathogenität des infizierenden Virusstammes. Nach Tröpfcheninfektion der Epithelzellen des oberen und unteren Atemweges, über deren Öffnung durch Virusneuraminidase dringen die Viren in die tieferen Zellschichten vor. Durch Anheftung des Hämagglutinins als zweitem Oberflächenrezeptor der Viren an die N-Acetylneuraminsäurerezeptoren der Zelloberfläche kommt es über Endozytose zum Einschleusen der Viruspartikel in das Zellinnere, dort zu deren Vermehrung, gefolgt von Zelltod und Virusausschleusung via Neuramidase mit weiterer Organbesiedelung.

Humoral gebildete Antikörper gegen das HA der Influenzaviren, auf deren Nachweis die Tests mit Aussage zum Immunschutzes beruhen (*Lange* 2007, *Ekiert* und *Wilson* 2012), können postinfektionell zwar in die Atemwege gelangtes, insgesamt extrazelluläres Virus neutralisieren – vorausgesetzt, sie gehören den mit dieser Fähigkeit ausgestatteten Subisotypen IgGa und IgGb des Pferdes an – intrazelluläres Virus dagegen erreichen sie nicht. Für die Ausbildung der wichtigen zellulären Immunität sind interne Antigene des Virus von Bedeutung, die in den handelsüblichen Impfstoffen nicht mehr vor-

handen sind. Darüber hinaus gehören die meisten der über Impfung erzielten, gegen das HA gerichteten Antikörper des Pferdes den Subisotypen IgGc und IgG (T) an (Wilson et al. 2001, Lange 2005, Lange 2007). Diese werden auch in den serologischen Tests ermittelt, sind aber für die Neutralisation des Virus von nachgeordneter Bedeutung beim Schutz vor Neuinfektion. Daraus resultiert ihre Limitierung als Maß für protektive Immunität, ermittelt in experimentellen Infektionen und serologischen Tests. Der Schutz vor Neu- und Reinfektion basiert in erster Linie nicht nur auf den genannten IgG-Subisotypen, sondern vor allem auf der Ausbildung eines spezifischen, möglichst Virusstamm übergreifenden, immunologischen Gedächtnisses. Hierzu ist eine endogene Antigenprozessierung mit Präsentation der virusspezifischen Peptide an MHC Klasse I und Klasse II-Moleküle erforderlich. Dieser Vorgang erfolgt in erster Linie nach Kontakt mit vermehrungsfähigem, nicht jedoch mit inaktiviertem Virus und/oder selektiven Virusanteilen, wie in der Mehrzahl handelsüblicher Impfstoffe eingesetzt. Entsprechend unterschiedlich ist das daraus entstehende, immunologische, B-zellassozierte Gedächtnis.

Der durch Einsatz dieser Impfstoffe induzierbare, extrazelluläre Schutz reicht i.d.R. nicht, um die Manifestation einer Infektion mit Influenzavirus und postvazinaler Virusausscheidung sicher zu verhindern, die klinisch inapparent verlaufende Infektion mit Etablierung von latetem Virus bei regulär geimpften Pferden mit entsprechenden Antikörpertitern kann daher die Folge sein (Daly et al. 2006, Gildea 2011). Diese klinisch unauffälligen Pferde mit transients Virusausscheidung sind weder klinisch noch über Labormethoden erfassbar (Daly et al. 2004). Unter Belastung, Stress, kann es zu Reaktivierung und Virusausscheidung kommen (Gross et al. 1998, Folsom et al. 2008, Beutemüller et al. 2016). Mit gut geimpften, also den Ansprüchen an die Antikörpertiter auf O.I.E.-Basis genügenden, latenten Virusträgern kann die Infektionskette der Influenza aufrechterhalten bleiben. So geschehen 2007, als durch klinisch gesunde, vakzinierter Importpferde eine H3|N8-Epidemie in Australien verursacht wurde, deren Kosten sich letztlich auf eine 1 Milliarde Australische Dollar belief (Callinan 2008, Garner et al. 2011). Unter diesen biologischen Gegebenheiten müssen auch die in experimentellen Infektionsversuchen an einer geringen Anzahl von Pferden ermittelten, selektiv gegen das HA der im Experiment eingesetzten H3|N8-Virusstämme gerichteten, humoralen Titer in der SRH von $\geq 85 \text{ mm}^2$ und $\geq 150 \text{ mm}^2$ bewertet werden. Damit haben sie bezüglich ihrer Aussage zum protektiven Immunschut nur gegenüber diesem homologen (autologen) Antigen Gültigkeit (Newton et al. 2000, Mumford 2001). Im Fall heterologer Infektionen werden zum Schutz höhere Antikörpermengen gefordert (Daly 2002, Daly et al. 2004, Gildea 2011, Newton et al. 2000). Hier stellt sich allerdings die Frage nach der tatsächlichen Höhe dieser geforderten Titer und deren Spezifität hinsichtlich einer geänderten Nukleotidsequenz im HA gedrifteter H3|N8-Viren. Nur bei klinisch apparentem oder inapparentem Kontakt zu diesem heterologen Virus wäre eine derartige Wirkung zu postulieren.

Entsprechend sind Infektionsbelastungsversuche, in denen die diskutierten „Schutztitern“ ermittelt werden, zu relativieren. Für eine absolute Aussage zum Immunschut und daraus abgeleiteter, serologischer Daten sind diese i.d.R. nur relativ geeignet. Die sehr begrenzten Pferdezahlen, die intranasale Infek-

tion mit meist schwächer virulenten Influenzaviren, deren Stammspezifität, die stressfreie Isolationshaltung der Pferde, die begrenzte postinfektionell, untersuchte Zeit der Virusausscheidung usw. können nicht verglichen werden mit der Situation einer virulenten Feldvirusinfektion. Die solcher Art durchgeführten Impfstoffprüfungen mit der Aussage zum daraus abgeleiteten Immunschut gegenüber homologer Infektion bringen dann die besten Ergebnisse, wenn die induzierten SRH-Impfantikörper optimal zum Zeitpunkt des Challenge korrelieren (Mumford und Wood 1993, O.I.E. 2008, Gildea 2011). Dies sind die Einschränkungen aller Infektionsexperimente ohne echte Analogie zu natürlichen Infektionen, deren, ebenso wie in den Tests ermittelte Ergebnisse, damit nicht als direktes Maß für eine protektive Immunität des Pferdes angesehen werden können. Darauf hatte auch Gildea (2011) hingewiesen. Auch die Persistenz der humoralen Antikörper und deren p. vacc. HA-Stammspezifität kann dafür nur bedingt herangezogen werden (Lange 2007, Cullinane et al. 2001, Cullinane 2009, Thein 2012, Gildea 2011, Elton and Cullinane 2013). Auch hierfür werden die in vorliegender Analyse in HAH und SRH ermittelten Titer in ihrer Relation und im Verhältnis zu den vorgegebenen O.E.I.-Werten beurteilt. Die Persistenz als Basis des belastbaren Schutzes humoraler Antikörper wird bei homologer Infektion mit 3 bis 6 Monaten, bei heterologer noch kürzer angegeben (Paillot et al. 2008, 2010, Gildea 2011, Elton and Cullinane 2013). Was sagen also über Impfung induzierte SRH-Titer, wie die in dieser Untersuchung ermittelten, im Bereich $\geq 150 \text{ mm}^2$ jeweils zum Zeitpunkt der angegebenen Monate dann noch zum Schutz dieser Pferde aus? Darüber hinaus ist beschrieben (Hannant et al. 1988, Paillot et al. 2006 und 2008), dass Pferde auch mit deutlich geringeren SRH-Titern als diesen gegenüber Reinfektion geschützt waren. Dies könnte dann auf den bereits erwähnten, auch klinisch inapparent verlaufenden Viruskontakten mit der Induktion weniger HA-gerichteter, humoraler Antikörper, als vielmehr komplexer, auch zellassoziierter Immunität beruhen.

Townsend et al. (2001) berichten in diesem Zusammenhang von der intranasalen Verimpfung eines temperatursensitiven Influenzavirus als Lebendimpfstoff. Damit geimpfte Pferde waren im Infektionsexperiment 6 Monate p. vacc. geschützt, ohne dass hohe Titer humoraler Antikörper nachzuweisen gewesen wären.

Weder die ermittelten, in den geschilderten Versuchen erbrachten klinischen noch serologischen Daten berechtigen dazu, daraus eine im Feld belastbare Immunität sowie deren Dauer über Antikörperpersistenz abzuleiten. Mit dem Einsatz derzeit verfügbarer Impfstoffe kann lediglich eine Aussage über deren jeweilige Potenz bezüglich Bildung, Titer und Persistenz impfbedingter Antikörper getroffen werden. Dies sollte bei Beurteilung der serologischen Ergebnisse Berücksichtigung finden, damit werden die diskutierten SRH-Werte des O.I.E. relativiert, da sie ihre Gültigkeit lediglich aus den genannten Challengeversuchen ableiten. Des Weiteren belegen die hier diskutierten Ergebnisse, dass hohe bis signifikante Titerunterschiede ($\geq 400\%$) auch bei identischen, in unterschiedlichen Labors untersuchten Pferden vorkommen und keine Korrelationen bezüglich dieser und den vergleichend ermittelten Ergebnissen in HAH und SRH existieren. Dieses Ergebnis reflektiert die Praxis mit den daraus abgeleiteten Aussagen zum Immunschut auf Basis der Möglichkeit unter-

schiedlicher Antikörperbefunde von Labor zu Labor und von Test zu Test. Wie dargestellt, ist eine Korrelation zwischen Antikörperquantität eines Pferdes und daraus abgeleiteter Immunprotektion so nicht objektivierbar, da zu viele unbeeinflussbare wie unkalkulierbare Variable für das Ergebnis verantwortlich sind.

Zumindest könnten bindende Vorschriften zur Durchführung genannter serologischer Untersuchungen, einheitliche Verwendung von Testantigenen (Referenzstämme) usw. im Sinne einer internationalen Standardisierung unter Begleitung von Ringversuchen eine denkbare Möglichkeit sein, um die Erarbeitung annähernd einheitlicher Ergebnisse zwischen den unterschiedlichen Instituten zu ermöglichen. Damit wäre wahrscheinlich eine bessere Korrelation zwischen den Ergebnissen der verschiedenen Tests und gewählten Testmethoden denkbar. Anders kann eine Aussage über serologische Ergebnisse in Relation zu einem belastbaren Immunschutzauch in deren biologischen Grenzen nicht erreicht werden.

Die in SRH und HAH ermittelten Antikörper und deren unterschiedliche Titer gegenüber verschiedenen Testantigenen sind in erster Linie gegen diese gerichtet. Bei deren Homologie mit den in den angewendeten Impfstoffen enthaltenen Antigenen auch gegen diese. Die erhaltenen Titerunterschiede, anamnestic Reaktionen infolge manifester oder inapparenter Influenzainfektionen ausgeschlossen, sind dann das Resultat unterschiedlicher Kreuzreaktivität zwischen Test- und Impfstämmen (Park et al. 2004). Optimal zur Erzielung annähernd belastbarer Ergebnisse wäre es, zum Test den tatsächlich jeweils aktuell infizierenden Feldstamm zur Verfügung zu haben und einsetzen zu können, zumindest generell bei H3|N8-Stämmen mit höchstmöglicher Homologie zur letzten H3|N8-Driftlinie. Das „mismatching“ zwischen Feld- und Testantigenen auf der Basis nur HA-haltiger Impfstoffe ist bezüglich dessen Folgen vergleichbar den klinischen zwischen Impfantigenen und aktuell infizierenden H3|N8-Viruspopulationen.

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, in wie weit die O.I.E.-Empfehlung zur Inkorporation des jeweils aktuellen H3|N8-Stammes und/oder dessen Einzelverwendung in den Impfstoffen, ganz abgesehen von einer zeitgerechten Realisierungsmöglichkeit, zu einer verbesserten Immunlage geimpfter Pferde beitragen kann und ob die Zeitdauer zwischen Impfung und nächster Drift Aufwand und Erfolg rechtfertigen. Ob sich dadurch die epizootologische Situation verbessern lässt, ist eine weitere Frage.

Trotz vermehrten Einsatzes auch aktuellerer Vakzinen wurden international immer wieder H3|N8-Ausbrüche registriert. Einige dieser Ausbrüche wurden durch importierte, zwar gut geimpfte, seropositive Pferde aus Europa, die aber nach Transportstress usw. infolge ihres bestehenden Virusträgerstatus im Ankunftsland zu Virusausscheidern wurden, verursacht, andere sowohl durch Pferde, die mit aktuell von O.I.E. empfohlenen H3|N8-Stämmen wie South Africa|1|03 oder anderen Vakzinen geimpft waren (Beutemüller et al. 2016, Gildea 2011, Elton and Cullinane 2013, Garner 2011). Solange diese Situation besteht, dass trotz der genannten Impfverpflichtung geimpfte Pferde zu Virusträgern und Virusausscheidern werden können, kann man nicht von einer postvakzinalen Verbesserung der epizootologischen Gesamtlage

ausgehen. Möglicherweise ist die schnelle Mutationsrate der H3|N8-Viren im HA-Gen auch als biologische Antwort auf die Situation dieser multipel mit unterschiedlichen H3|N8-Antigenen in kurzen Intervallen geimpften Pferde zu verstehen. Deren Antikörperspektrum erfordert eine Überlebensstrategie seitens dieser Viren, welche nur im Umgehen der Immunitätslage der Pferdepopulation bestehen kann. Die Virusausscheidung aus geimpften Pferden korreliert zum Grad der immunogenen Beziehungen zwischen Feldvirus und Impfantigen. Von Elton und Cullinane (2013) ist von irischen Influenzaausbrüchen beschrieben, dass diese Kreuzreaktivität über die Jahre offenbar abgenommen hat.

Seit Beginn der Entwicklung von Influenzaimpfstoffen, nicht nur für das Pferd, beschäftigen sich Forschung und relevante Impfstoffindustrie mit der Frage, welche Art von Vakzine unter Verwendung welcher Virusbestandteile mit welchen Begleit- und Hilfsstoffen den besten Immunschutz bewirken kann. Konsens besteht wohl darüber, dass der beste Impfstoff nur der sein kann, der der immunogenen Wirkung des kompletten, vermehrungsfähigen Virus am nächsten kommt. Dazu sind nicht nur – wie derzeit praktiziert – externe Oberflächenproteine, sondern ex- und interne Immunogene des Virus notwendig, die sowohl eine Schleimhautimmunität wie eine humorale und zelluläre, dann wirklich protektive Immunantwort induzieren können (Paillot et al. 2006, Lange 2007, Gildea 2011, Thein und Röhm 2016). Auch die Verwendung stärker konservierter Regionen der Influenzaviren als die derzeit in Impfstoffen verwendeten, könnten einen stabileren Kreuzschutz bewirken (Ekiert and Wilson 2012). Zur Erfassung dieser Immunparameter müssten weitere In vitro-Tests als die derzeit praktizierten zum Einsatz kommen.

H7 N7-Antikörper

Innerhalb der vorliegenden Daten ist deren hoher Anteil H7|N7-positiver Seren auch deshalb auffällig, da diese bei Pferden nachgewiesen wurden, die entweder nie A1-haltige Impfstoffe erhalten hatten, oder deren letzte Impfung laut Pferdepässen mit bivalenter A1-haltiger Vakzine bis zu 4,5 Jahren vor Serumentnahme erfolgte. Zu diesen Gruppen zählen vor allem junge Pferde der Jahrgänge 2011 bis 2013, die ab ihrer ersten Impfung nur mit H3|N8-haltigen Vakzinen geimpft worden waren. H7|N7-Influenzaviren des Pferdes sind nicht mehr in der wissenschaftlichen Diskussion seit ihrem letzten europäischen Nachweis in Deutschland 1976 und Kroatien 1996 (Thein 2008 und 2012). In diesem Zusammenhang wird auch von einer 'frozen evolution' gesprochen (Borchers et al. 2005), was einen latenten, evolutionsbiologischen Vorgang zu Grunde legt. Allerdings sind H7-haltige Influenzaviren in der Biozoonose bei anderen Spezies immer wieder mit klinisch manifesten Infektionen in Erscheinung getreten. Ihr Vorkommen vor allem bei Wassergeflügel mit von dort ausgehender Verbreitung auch in andere Spezies hat ihren Zoonosecharakter befestigt. Erwähnt sei eine in Italien nachgewiesenen H7|N7-Infektion im Gefolge einer Geflügelpest, die bei einer Frau zu einer manifesten Conjunctivitis führte (Capua und Alexander 2002). Das Kursieren der H7-haltigen Influenzaviren in der Warmblüterpopulation ist bekannter Bestandteil von deren epidemiologischem Spektrum. Zu diesem Spektrum rezeptiver, permissiver Organismen zählt auch das Pferd, sodass nie auszuschließen

ist, dass es in dieser Infektionskette wieder auftauchen kann. Unkalkulierbare Infektionswege dieser Viren mit ihrem Zoonosecharakter sind immer möglich. Unter diesem Gesichtspunkt ist zumindest die Frage berechtigt, wie sinnvoll es ist, in Folge der diesbezüglichen O.I.E.-Empfehlung nur noch H3|N8-Impfantigene einzusetzen und der Pferdepopulation damit die H7|N7-Impfkonfrontation vorzuenthalten. Die erhaltenen A1-Ergebnisse lassen nur den Schluss zu, dass bei glaubhaft nachgeprüften Impfungen (Chargenkontrolle) ohne H7|N7-Vakzinen und der Annahme, dass keine klinisch inapparenten A1- Infektionen stattgefunden hatten, die hohe Antikörperprävalenz die Folge einer bis zu 4,5 jährigen Antikörperpersistenz wäre. Bislang sind keine dazu vorliegenden Untersuchungen mit vergleichbarem Resultat bekannt.

Immunologische Lücke

Bezüglich der angeführten „immunologischen Lücke“ zwischen V2 und V3 der Grundimmunisierung können hier keine direkten Aussagen getroffen werden, da entsprechende Seren nicht zur Verfügung standen. Die Einzeltiter der jungen Stuten im Pool der Seren des Gestütes M lagen tendenziell über denen der alten Stuten. Die Mittelwerte der 18 Stuten der Jahrgänge 2011 bis 2013, die lediglich vier- bis achtmal geimpft worden waren, betrugen in der H3|N8-HAH (Stamm Kildare) 1:236, resp. 1:416 (Stamm Meath|1|07). Die analogen Titer der 86 Stuten der Jahrgänge 1995 bis 2009 mit sehr viel häufigeren Impfungen betrugen 1:192 resp. 1:400. Sollte also je eine derartige „Lücke“ existieren, machte sie sich hinsichtlich der folgenden Impfungen und deren Antikörperinduktion nicht bemerkbar. Die in den Untersuchungen von Ryan et al. (2011) beschriebene rückläufige Tendenz der SRH-Titer versus Boosterreaktion auf die Impfungen wird mit der These diskutiert, ob häufige Impfungen und/ oder Infektionen neue Plasmazellgenerationen induzieren, die die alten antigen-geprägten verdrängen und damit einen negativen Einfluss auf das immunologische Gedächtnis ausüben könnten. In Immunisierungsversuchen unter vergleichendem Einsatz der verfügbaren Influenzaimpfstoffe ist von Gildea (2011) berichtet, dass Vollblutfohlen im Durchschnittsalter von 235 Tagen der Erstimpfung unterzogen und danach auf ihre Antikörperreaktion gegenüber den Folgeimpfungen kontrolliert wurden. 43% der Erstimpflinge hatten diese V1 nicht serologisch beantwortet, nach V2 reduzierte sich dieser Anteil auf 7% und nach V3 reagierten 100% der Impflinge seropositiv. Der Impfstoff Duvaxyn IE schnitt hierbei zur initialen Antikörperinduktion am besten ab, was möglicherweise auf dem in diesem Impfstoff vorhandenen Adjuvans beruht (Ryan et al. 2015). Auf die diskutierte „Lücke“ gibt es in dieser Untersuchung keinen Hinweis. Einen spezifischen Impfstoff zur „Schließung dieser Lücke“ (MSD 2017), die keine Konstante ist, kann es auch wegen deren Fehlens nicht geben.

Wie die vorliegenden Ergebnisse signalisieren, sollte man die derzeit vom O.I.E. vorgegebenen Antikörpertiter der SRH nicht als absolutes Maß ansehen, um daraus eine bindende Aussage zum Immunschutzes des individuellen Pferdes abzuleiten. Dazu sind sie und die Art ihrer serologischen Ermittlung von zu vielen technischen wie immunologischen Faktoren abhängig sowie in dieser Form nicht objektivierbar. Das komplexe Abwehrsystem des Pferdes, dessen antigene Erfahrungen und durch derzeitige Labortests nicht identisch erfassbare

Umsetzung können weder durch HAH- noch SRH-Ergebnisse einen sicheren Rückschluss gewährleisten und korrelieren nur bedingt zu deren Ergebnissen. Sowohl international verbindliche Vorschriften zur technischen Durchführung, verwendete Testantigene, Standardisierung und internationale Ringversuche könnten zumindest für eine bessere Objektivierung sorgen. Für eine Verwendung der derzeit als relevant angegebenen, quantitativen Werte der SRH als ‚Basis‘ für Kontroll- und Regulierungsmaßnahmen im nationalen wie internationalen Pferdesport und -handel ist dies eine *conditio sine qua non*.

Literatur

- Barquero N., Daly J. M., Newton J. R. (2007) Risk factors for influenza infection in vaccinated racehorses: lessons from an outbreak in Newmarket, UK in 2003. *Vaccine* 25, 7520-7529
- Beutemüller E. A., Woodward A., dos Santos Ferraz L. E., Alfieri A. F., Alfieri A. A., Elton D. (2016) Characterisation of the epidemic strain on H3N8 equine Influenza virus responsible for outbreaks in South America in 2012. *Virology* 90, 13-45; DOI 10.1186/s12985-016-0503-9
- Borchers K., Daly J., Stiens G., Kreling K., Kreling I., Ludwig H. (2005) Characterisation of three equine influenza A H3N8 viruses from Germany (2000 and 2002): evidence for frozen evolution. *Med. Microbiol.* 107, 13-21
- Bryant N. A., Rush A. S., Russell C. A., Ross J., Cooke A., Bowman S. MacRae S., Lewis N. S., Paillot R., Zanoni R., Meier H., Griffith L. A., Daly J. M., Tiwari A., Chambers T. M., Newton J. R., Elton D. M. (2009) Antigenic and genetic variations in European and North American equine influenza virus strains (H3N8) isolated from 2006 to 2007. *Vet Microbiol.* 138, 41-52
- Bryant N. A., Paillot R., Rash A. S., Medcalf E., Montesso F., Ross J., Watson J., Jeggo M., Lewis N. S., Newton J. R., Elton D. M. (2010) Comparison of two modern vaccines and previous influenza infection against challenge with an equine influenza virus from the Australian 2007 outbreak. *Vet. Res* 41, 19
- Callinan I. (2008) The August 2007 Outbreak in Australia. Commonwealth of Australia. Available from: www.equineinfluenzainquiry.gov.au
- Capua J., Alexander D. J. (2002) Avian influenza and human health. *Acta Tropica* 83, 1-6
- Cullinane A., Weld J., Osborne M., Mc Bride C., Walsh C. (2001) Field studies on equine influenza vaccination regimes in thoroughbred foals and yearlings. *Vet. J.* 161, 174-185
- Cullinane A. (2009) Equine Influenza – A constantly evolving challenge. *Equine Vet. Educ.* 8, 1-7
- Cullinane A., Elton D., Mumford J. (2010) Equine influenza – surveillance and control. *Influenza Other Respi Viruses*, 4, 339 – 344
- Daly J. (2002) Vorbeugung der Pferdeinfluenza. In: Optimierung des Impfmanagements gegen Atemwegserkrankungen beim Pferd. Arbeitsgruppe Pferd, Hrsgb., A. Lindner, Band 126, 41-51
- Daly J. M., Newton J. R., Mumford J. A. (2004) Current perspectives on control of equine influenza. *Vet Res.* 35, 411-423
- Daly J. M., Newton J. R., Smith K. C., Mumford J. A. (2006) Epidemiology of equine influenza viruses: pathogenicity and transmissibility. *Rad. Med. Sci.* 30, 87-94
- Ekiert D. C., Wilson I. A. (2012) Broadly neutralizing antibodies against influenza virus and prospects for universal therapies. *Curr. Opin. Virol.* 134-141
- Elton D., Cullinane A. (2013) Equine Influenza: Antigenetic drift and implications for vaccines. *Equ. Vet. J.* 45, 768-769
- Folson R. W., Littlefield-Choba M. A., French D. D., Purcian S. S. (2001) Exercise alters the immune response to equine influenza virus and increased susceptibility to infection. *Equine Vet. J.* 33, 664-669
- Garner M. G., Cowled B., East I. J., Moloney B. J., Kung N. Y. (2011) Evaluating the effectiveness of early vaccination in the control and eradication of equine influenza-a modelling approach. *Prev. Vet. Med.* 99, 15-27

- Gildea S. (2011) Equine influenza virus: Characterisation, epidemiology and vaccination. PHD- Thesis, University of Limerick, Ireland
- Gross D. K., Hinchcliff K. W., French P. S., Goclan S. A., Lahmers K. K., Lauderdale M., Ellis J. A., Haines D. M., Slemons R. D., Morley P. S. (1998) Effect of moderate exercise on the severity of clinical signs associated with influenza virus infection in horses. *Equine Vet. J.* 30, 489-497
- Hannant D., Mumford J. A., Jesset D. M. (1988) Duration of circulating antibody and immunity following infection with influenza virus infection in horses. *Equine Vet. Rec.* 122, 125-128
- Lange C. (2005) Prüfung von Influenzaimpfstoffen an jungen Pferden. Diss. Med. Vet. Bern
- Lange W. (2007) Pferde- Influenza, Virologie, Epidemiologie, Klinik, Therapie und Prophylaxe. 2. Aufl., W. Lange Hrsgb., MVS- Medizinverlag Stuttgart
- MSD Tiergesundheit/ Intervet Deutschland GmbH (2017) Pferde- grippe – neue Studie zur Immunitätslücke. *Dtsch. Tierärztebl.* 5, 65, 711
- Mumford J. A., Wood J. (1992) Establishing an acceptability threshold for equine influenza vaccines. *Dev. Biol. Stand.* 79, 137-146
- Mumford J. A. (2001) Biology, epidemiology and vaccinology of equine influenza. *Proceedings of the International Symposium, Budapest*, 10.-11. December 2001
- Newton J. R., Townsend H. G., Wood J. L., Sinclair R., Hannant D., Mumford J. A. (2000) Immunity to equine influenza: relationship of vaccine-induced antibody in young thoroughbred racehorses to protection against field infection with influenza A/equine-2 viruses (H3/N8). *Equine Vet. J.* 32, 65-74
- O.I.E. (2008) Equine Influenza. O.I.E. Terrestrial Manual, Chapter 2.5.7., 871-883
- Paillot R., Hannant D., Kydd J. H., Daly J. M. (2006a) Vaccination against equine influenza: Quid novi? *Vaccine* 24, 4047-4061
- Paillot R., Grimmet H., Elton D., Daly J. M. (2008) Protection, systemic IFN γ , and antibody responses induced by an ISOM-based vaccine against a recent equine influenza virus in its natural host. *Vet. Res.* 39, 21-26
- Paillot R., Prowse L., Donald C., Medcalf E., Montesso F., Bryant N., Watson J., Jeggo M., Elton D., Newton R., Trail P., Barnes H. (2010) Efficacy of a whole inactivated EI vaccine against a recent EIV outbreak isolate and comparative detection of virus shedding. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 136, 272-283
- Park A. W., Woog J. L., Daly J. M., Newton J. R., Glass K., Henley W., Mumford J. A., Grenfell B. T. (2004) The effect of strain heterology on the epidemiology of equine influenza in a vaccinated population. *Proc. Biol. Sci.* 271, 1547-1555
- Ryan M., Gildea S., Walsh C., Cullinane A. (2015) The impact of different influenza vaccine products and other factors on equine influenza antibody levels in Thoroughbred racehorses. *Equine Vet. J.* 47, 662-666
- Thein P. (2008) Die Influenza des Pferdes: Aktuelle Übersicht. Duva- xyn Impfstoffsymposium, Fort Dodge, Travemünde, 24.07.2008
- Thein P. (2012) Virusinfektionen der Atemwege des Pferdes – Ätiologie, Epidemiologie, Klinik und Immunpräventive- Teil1: Equine Influenza- viren und Equine Herpesviren, *Pferdeheilkunde* 28, 675-696
- Thein P., Röhm A. (2016) Bestandsimpfungen beim Pferd: 44 Jahre Impfungen im Haupt- und Landgestüt Marbach a. d. Lauter /1972-2015) *Infektionsmedizinische Aspekte. Pferdeheilkunde*, 32, 200-212
- Townsend H. G., Penner S. J., Watts T. C., Cook A., Bogdan J., Haines D. M., Griffin S., Chambers T., Holland R. E., Whitaker-Dowling P., Younger J. S., Sebring R. W. (2001) Efficacy of a cold-adapted, intranasal, equine influenza vaccine: challenge trials. *Equine Vet. J.* 33, 637-643
- Wilson W. D., Mihalyi J. E., Hussey S., Lunn P. D. (2001) Passive transfer of maternal antibodies against tetanus and influenza and their effect on the response of foals. *Equine Vet. J.* 33, 644-665