

**Tierärztliche Hochschule Hannover**

**Influenza-Impfung bei Pferden: Verlauf der  
Antikörper-Titer nach einer Booster-Impfung und  
Vergleich dreier Impfstoffe**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Veterinärmedizin  
- Doctor medicinae veterinariae -  
(Dr. med. vet.)

vorgelegt von  
Johanna Entenfellner  
Lilienfeld, Österreich

Hannover 2018

Wissenschaftliche Betreuung: PD Dr. Monica Venner PhD, Dipl. ECEIM  
Klinik für Pferde, Stiftung Tierärztliche Hochschule  
Hannover

1. Gutachterin: PD Dr. Monica Venner PhD, Dipl. ECEIM  
Klinik für Pferde, Stiftung Tierärztliche Hochschule  
Hannover

2. Gutachter: Apl.- Prof. Dr. Ludwig Haas, Institut für Virologie-Zentrum  
für Infektionsmedizin, Stiftung Tierärztliche Hochschule  
Hannover

Tag der mündlichen Prüfung: 03.05.2018 in Hannover

**WIDMUNG:**

Ich widme diese Doktorarbeit  
meinem Schatz Max,  
meinen Eltern Karin und Ferdinand  
und meiner Gretioma



<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>Seite</b>
1. EINLEITUNG	1
2. LITERATURÜBERSICHT	3
2.1. Influenza Allgemein	3
2.2. Equines Influenzavirus A	3
2.2.1. Erreger	3
2.2.2. Epidemiologie	6
2.2.3. Pathogenese	7
2.2.4. Klinik	8
2.2.5. Diagnostik	9
2.2.6. Therapie	10
2.2.7. Prophylaxe	12
2.3. Immunologie	12
2.3.1. Grundlagen der Immunantwort und Antikörperbildung nach Influenzainfektionen beim Pferd	12
2.3.2. Technologie von Impfstoffen und die dadurch induzierte Immunantwort	14
2.3.3. Immunantwort und Antikörpertiterverlauf nach Influenzaimpfungen	16
2.3.4. Nachweismethoden von Antikörpern	18
2.4. Impfvorgaben verschiedener Gremien im Reitsport und Anwendungsempfehlungen der Impfstoffhersteller	19
3. MATERIAL UND METHODE	22
3.1. Tiere und Material	22
3.1.1. Versuchsaufbau kurz zusammengefasst	22
3.1.2. Probanden	23
3.1.3. Gebrauchsmaterialien	23
3.1.4. Angewandte Impfstoffe inklusive Technologie	23
3.1.4.1. Duvaxyn IE TPLUS	24
3.1.4.2. Equip FT	24
3.1.4.3. ProteqFlu TE	25
3.2. Methodik	25
3.2.1. Darstellung, Ablauf und Detailplan	25
3.2.2. Klinisch diagnostische Methode	26

3.2.3. Serologische Methode	28
3.2.4. Statistik	31
4. ERGEBNISSE UND STATISTIK	33
4.1. Anzahl der Probanden	33
4.2. Alter der Pferde	33
4.3. Geschlechterverteilung	34
4.4. Impfstatus der Probanden zu Beginn der Studie	35
4.5. Verlauf der Inneren Körpertemperatur in Folge der Impfung	36
4.6. Systemische und lokale Nebenwirkungen in Folge der Impfung	38
4.7. Immunantwort	39
4.7.1. Antikörpertiter der Pferde am Tag der Impfung D0	39
4.7.2. Antikörpertiterbildung gegen <i>A/equine/SouthAfrica/4/2003</i> und <i>A/equine/Richmond/1/07</i>	40
4.7.3. Verlauf der Antikörpertiter der Pferde in den drei Impfstoffgruppen	42
4.7.3.1. Vergleich des SRH-Verlaufes zwischen Duvaxyn IE T Plus <sup>®</sup> und Equip FT <sup>®</sup>	43
4.7.3.2. Vergleich des SRH-Verlaufes zwischen Duvaxyn IE T Plus <sup>®</sup> und Proteq Flu Te <sup>®</sup>	43
4.7.3.3. Vergleich des SRH-Verlaufes zwischen Equip FT <sup>®</sup> und Proteq Flu Te <sup>®</sup>	44
4.7.4. Anstieg der Antikörpertiter von D0 bis D21	44
4.7.5. Korrelationen in Bezug auf den Anstieg der Antikörpertiter von D0 bis D21	46
4.7.6. Anstieg der Antikörpertiter von D0 bis D7, D7 bis D14, D14 bis D21	46
4.7.7. Verlauf der Antikörpertiter von D21 bis D201	47
4.7.8. Schützender Titer der Antikörper	48
5. DISKUSSION	50
5.1. Anzahl der Probanden	50
5.2. Die Innere Körpertemperatur der Pferde in Folge der Impfung	50
5.3. Lokale Reaktionen an der Injektionsstelle in Folge der Impfung	50
5.4. Antikörpertiter der Pferde an D0 und Schutz	51
5.5. Antikörperbildung gegen kursierende Stämme	52
5.6. Allgemeine Erkenntnisse im Zusammenhang mit dem Antikörpertiter	53

5.7. Verlauf der Antikörpertiter der Pferde in Folge der Impfung	54
5.8. Wartezeit nach einer Impfung bis zum Transport eines Pferdes	55
5.9. Empfehlung: Impfintervalle	55
6. ZUSAMMENFASSUNG	58
7. SUMMARY	60
8. LITERATURVERZEICHNIS	62
9. ANHANG	81
10. ABBILDUNGS- und TABELLENVERZEICHNIS	96
11. DANKSAGUNG	98
12. SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	99

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
-ssRNA	negative einzelsträngige Ribonukleinsäure
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Al(OH) <sub>3</sub>	Aluminiumhydroxid
AM	American
bzw.	beziehungsweise
CrCl <sub>3</sub>	Chromchlorid
cRNA	komplementäre Ribonukleinsäure
D	days - Tage
DFA	Directigen Flu A
DIVA	differentiate between infection and vaccination
EDQM	European Directorate for the Quality of Medicines
EHV	Equines Herpes Virus
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent Assay
eq	equine
EU	European
FAID <sub>50</sub>	im Fluoreszenz- Assay ermittelte zellkulturinfektiöse Dosis
FEI	Fédération Équestre Internationale
FN	Fédération Équestre Nationale
g	gramm
G	Gelding (Wallach)
Gr	Gruppe
HA	Hämagglutinin gemessen mittels SRD- Test
HBS	Hepes buffered Saline
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
IE	Internationale Einheiten
IFHA	International Federation of Horseracing Authorities
IKT	Innere Körpertemperatur
Inc.	Incooperation

IPC	Internal Positive Control
ISCOM	Immune stimulating Complexes
ITE	Influenza- Tetanusvakzine
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumhydrogenphosphat
l	Liter
LALLF M-V	Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern
M	Mare (Stute)
max	maximal
mcg	mikrogramm
mg	milligramm
MHC I	Haupthistokompatibilitätskomplex I
MHC II	Haupthistokompatibilitätskomplex II
min	minimal, Minute
ml	milliliter
mm	millimeter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
NA	Neuraminidase
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NSAID	Nichtsteroidales Antiphlogistikum
OIE	World Organisation for Animal Health
q.s.	quantum satis
RAD	Rapid Antigen Detection
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	rounds per minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
S	Stallion (Hengst)
Saline Hepes BSA	Saline Hepes Bovines Serum Albumin
SD	Standardabweichung
SRBC	Sheep Red Blood Cells

SRD	Single Radial Diffusion
SRH	Single Radial Haemolysis
SRH PBS	Single Radial Haemolysis Phosphate buffered Saline
Stlko	Ständige Impfkommision
Tbl.	Tabelle
USA	United States of America
V	Vaccination (Impfung)
vCP	viral channel forming Protein
VI	Virusisolation

## 1. EINLEITUNG

Das Pferd bzw. der Reitsport sind sowohl zur Freizeitgestaltung, als auch als wichtiger Wirtschaftsfaktor in unserer Gesellschaft vertreten. Nicht nur im Mittelalter wurden Pferde als Nutztiere eingesetzt, auch heute gibt es noch etliche Regionen, in denen Pferde ausschließlich als Nutztiere gehalten werden. Während für die Landwirtschaft eher schwere Kaltblüter zum Einsatz kommen, werden in der Vielfalt des Reitsports eher sportlichere Pferde genutzt. In den olympischen Disziplinen des Sports finden vor allem Warmblüter und im Rennsport Vollblutpferde Einsatz. Dementsprechend ist die Gesundheit der Pferde ein wichtiger Aspekt in der Pferdehaltung, sowohl bei den Nutztieren, als auch bei den Reitpferden. Im Laufe der Zeit entwickelten sich der Reitsport und der Handel mit Pferden zu einem globalen und internationalen Geschehen. Der dadurch entstandene stetige Transport von Pferden und der damit verbundene Kontakt der Pferde untereinander erhöht das Risiko von Infektionskrankheiten, insbesondere auch der equinen Influenza (MYERS et al., 2006). Erkrankungen des Atmungstraktes gehören mit zu den bedeutendsten Krankheiten der Equiden (SOVINOVA et al., 1958; WADDEL et al., 1963). Die Pferdeinfluenza ausgelöst von einem Orthomyxovirus, Influenza A, spielt auf diesem Sektor eine wichtige Rolle. Sie ist eine hochkontagiöse, respiratorische Erkrankung von Pferden, die zu hohen wirtschaftlichen Verlusten im Sinne von Behandlungskosten, Leistungseinbußen und Transporteinschränkungen führt (POUWELS et al., 2014). Schon im Jahre 1903 wurden die Symptome für Influenza von Schmidt beschrieben. Ausbrüche der Krankheit wurden bereits auf der ganzen Welt, mit Ausnahme der Inseln Neuseeland und Island, dokumentiert (ANON, 2012). Obwohl die Verwendung von Impfstoffen gegen Influenza seit Jahren weltweit verbreitet ist, bleibt die equine Influenza eine der häufigsten Infektionskrankheiten der Pferde (WILSON, 1993). In Deutschland ist die Impfung von Pferden gegen Influenza national durch die Reiterliche Vereinigung (FN) und die Ständige Impfkommision (StIKo) und international durch die World Organisation for Animal Health (OIE), die Fédération Equestre Internationale (FEI) und die International Federation for Horseracing Authority (IFHA) geregelt. Es besteht allerdings noch keine homogene Angabe dieser

Gremien über den Zeitpunkt der Influenzaimpfung vor dem Import und Export oder vor dem Start auf einem Turnier oder Pferderennen. Dabei geht es nicht nur um die Erholung der Pferde nach der Impfung, sondern vielmehr darum, den Pferden Zeit zu geben, eine adäquate Immunantwort entstehen zu lassen und ausreichend Antikörper zu bilden, um gegen Influenza geschützt zu sein.

### **ZIELSETZUNG**

Um die Risiken der equinen Influenza als Infektionskrankheit zu minimieren, ist es Ziel dieser Arbeit, den Antikörpertiterverlauf nach einer Booster-Impfung gegen Influenza darzustellen. Aufgrund der unterschiedlichen arzneilich wirksamen Bestandteile und Technologien der Impfstoffe ist anzunehmen, dass es auch Unterschiede in der humoralen Antwort von Pferden nach einer Influenza-Impfung gibt. Demnach reagierten Pferde, die mit einem Kanarienspockenvirus-basierten Impfstoff geimpft wurden, erst später mit einer Antikörperbildung, als Pferde, die mit einem ISCOM-basierten Impfstoff oder inaktivierten Impfstoff geimpft wurden (GILDEA et al., 2011a,b). Aufgrund dieser Tatsache sollen hier drei der in Europa für Pferde zugelassenen kombinierten Influenza-Tetanus Impfstoffe, verglichen werden. Mit diesen Daten sollen die bereits genannten Gremien eine wissenschaftliche Basis für die Entscheidung über den optimalen Zeitpunkt für die Influenzaimpfung vor dem jeweiligen Transport des Sportpferdes zu einer Pferdesportveranstaltung bzw. Import oder Export des Pferdes, bekommen.

## 2. LITERATURÜBERSICHT

### 2.1. Influenza Allgemein

Influenzaviren gehören zur Familie der Orthomyxoviridae, zu denen neben den Influenzaviren A, B und C, die respiratorische Erkrankungen auslösen, auch die Thogotoviren gehören (WRIGHT et al., 2001). Diese Spezies der Gattung Thogotovirus sind die einzigen Orthomyxoviridae, die nicht den Respirationstrakt befallen, sondern durch Zecken auf Wirbeltiere übertragen werden und fiebrige Erkrankungen hervorrufen (KAUFMANN et al., 2003). Influenza ist eine Zoonose, wobei das primäre Virusreservoir in der Wildpopulation der Wasservögel liegt. Das Influenzavirus A kann nicht nur beim Pferd, sondern auch bei anderen Säugetieren, wie Schwein oder auch dem Menschen, ebenso wie bei einigen Geflügelarten, eine Erkrankung verursachen (WEBSTER et al., 1992). Equine Influenzaviren werden auch mit respiratorischen Erkrankungen von Hunden, z.B. in Nordamerika assoziiert (CRAWFORD et al., 2005). Es gibt aber noch keine dokumentierten Fälle einer Übertragung des Virus von dem Hund auf das Pferd (YAMANAKA et al., 2012). Neben den Hunden gibt es auch anekdotische Berichte über die zoonotische Infektion von Menschen mit equiner Influenza (ALEXANDER et al., 2000).

### 2.2. Equines Influenzavirus A: Erreger, Epidemiologie, Pathogenese, Klinik, Diagnostik, Therapie und Prophylaxe

#### 2.2.1. Erreger

Das equine Influenzavirus besteht aus 8 Segmenten einer einzelsträngigen RNA mit negativer Polarität als Genom (-ssRNA), welche für insgesamt 10 Proteine: die zwei Oberflächenglykoproteine, drei Polymeraseproteine, ein Nukleoprotein, zwei Matrixproteine, ein Nuklear-Export-Protein und ein Nicht-Strukturprotein 1 (NS1), codieren (MUMFORD et al., 1992a; VAN MAANEN et al., 2002; ANDINO et al., 2015). Diese RNA-Segmente sind mit Nukleoproteinen beschichtet, welche zusammen mit einem Komplex aus Polymeraseenzymen das Nukleokapsid bilden und für die Transkription und Replikation des Virus im Zellkern der Wirtszelle verantwortlich sind. Alle diese Segmente bzw. Komplexe sind umgeben von den strukturgebenden

Matrixproteinen, welche von einer Lipiddoppelmembran umhüllt sind. In dieser Lipiddoppelmembran verankert sind die beiden Oberflächenantigene Hämagglutinin HA und Neuraminidase NA. Das HA hat enormen Einfluss auf die Wirkung von Impfungen oder sonstigen antiviralen Medikamenten (CULLINANE et al., 2013; MYERS et al., 2006). Hämagglutinin ist jenes Glykoprotein, welches verantwortlich für die Bindung an die Wirtszelle ist. Der Wirt kann daraufhin Antikörper gegen das HA bilden und die Bindung des Virus an seine Zellen verhindern (SKEHEL et al., 2000). Neuraminidase kann die Mukosa im Respirationstrakt durchgängig für das Virus machen, sodass dieses die darunterliegenden Epithelzellen befallen kann. Das Glykoprotein Neuraminidase spielt auch eine wichtige Rolle in der Freisetzung des replizierten Virus aus der Wirtszelle (SETO et al., 1966; MATROSOVICH et al., 2004). Die equinen Influenzaviren haben an den Zelloberflächen eine Affinität für die Sialinsäurerezeptoren, die  $\alpha$  2-3 Galaktose enthalten (MYERS et al., 2006; CULLINANE et al., 2013). (siehe Abb. 1).

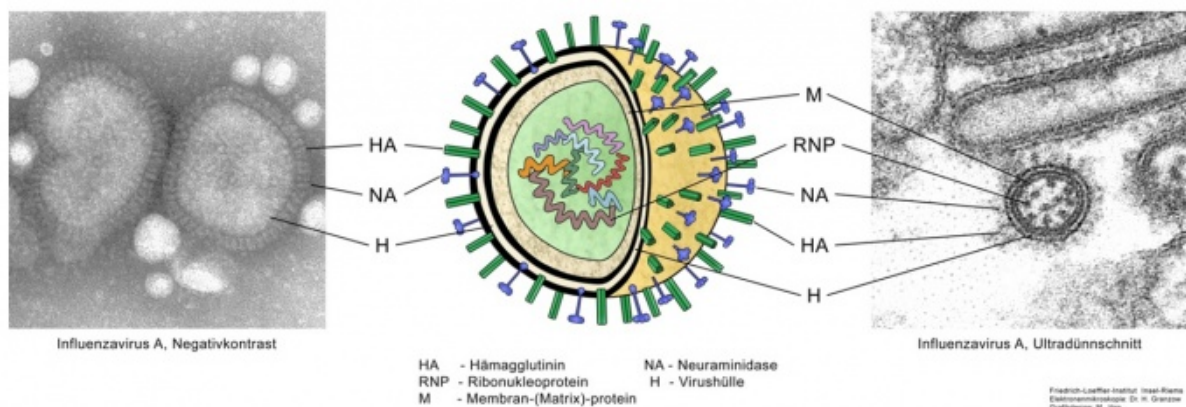


Abbildung 1: Aufbau eines Influenzavirus A (Quelle: Friedrich-Loeffler-Institut Insel-Riems, Elektronenmikroskopie: Dr. H. Granzow, Grafikdesign: M. Jörn.)

Insgesamt gibt es ca. 18 beschriebene Hämagglutinin- und 11 Neuraminidase-Komponenten, die zusammen als Subtypen definiert werden (TONG et al., 2013; KU et al., 2014). Es treten viele verschiedene Kombinationen dieser Subtypen auf. Das aviäre H5N1 wird zwar mit Erkrankungen des Respirationstraktes von Eseln in Ägypten assoziiert (ABDEL-MONEIM et al., 2010), aber nur 2 Subtypen wurden bis

jetzt bei Pferden identifiziert. Diese beiden Subtypen sind eine Kombination aus H7N7 und H3N8 (VAN MAANEN et al., 2002). Equines Influenzavirus 1 H7N7 wurde erstmalig 1956 von Pferden in Prag isoliert und als Prototyp A/Equi1/Prague/1/56/H7N7 bezeichnet (SOVINOVA et al., 1958). Anhand dieses Beispiels kann man Einblick die Nomenklatur der Influenzaviren erhalten, die sich folgendermaßen zusammenstellt: Typ des Influenzavirus/ Spezies und Subtyp/ Fundort des Virus/ laufende Nummer des Isolats/ Jahr der Isolierung/ Formel der Oberflächenantigene. Der zweite Subtyp des equinen Influenzavirus wurde 1963 von Pferden in Florida isoliert: A/Equi2/Miami/1/63/H3N8 (WADDEL et al., 1963). Diese beiden Subtypen zirkulierten für viele Jahre in Pferden, wobei man davon ausgeht, dass H7N7 ausgestorben ist, da es schon seit vielen Jahren nicht mehr isoliert wurde. Seit 1977 wurden alle isolierten Influenzaviren beim Pferd, dem H3N8 Subtyp zugeteilt (WEBSTER, 1993).

Wie bereits erwähnt, besteht ein Influenzavirus aus 8 Segmenten, wobei jedes Segment ein Gen ist und für eines der Virusproteine kodiert. An der Oberfläche sind dies die Proteine HA und NA. Aufgrund dieser Besonderheit kommt es zu der hohen Variabilität der Influenzaviren. Es kann zu Antigen shift kommen, wenn die Wirtszelle gleichzeitig mit zwei verschiedenen Virusstämmen infiziert wird. Die RNA-Segmente werden dann neu sortiert und es entsteht ein neuer Subtyp (STUDDERT, 1996). Man nimmt an, dass viele dieser Influenzastämme, die Pferde und Menschen nach einer Neusortierung infizieren können, in Vögeln und anderen Säugetieren, wie z.B. Schweinen auftreten. Neben der Antigen shift kommt es auch zu Antigen drift beim equinen Influenzavirus. Punktmutationen in den HA- und NA-Genen führen z.B. zur Veränderung der Aminosäuresequenzen im Protein, wodurch es zu signifikanten Unterschieden in der Antigenität des Virus kommt (SAITO et al., 1993). Aufgrund dieser Mutationen bzw. der Antigen drift entwickelten sich aus dem H3N8 Subtypen in den 80er Jahren zwei hervorzuhebende Linien des Virus: Die amerikanische Linie und die europäische Linie (DALY et al., 1996). Man nimmt an, dass es durch diese signifikante Antigen drift zu den seltenen Impfmisserfolgen kommt (MYERS et al., 2006). Die amerikanische Linie hat sich weiter in 3 Sublinien unterteilt, die Kentucky-Sublinie, die South- American-Sublinie und die Florida-Sublinie (LAI et al., 2001),

wobei sich die Florida-Sublinie wiederum in zwei sogenannte Clades (Florida Clade 1 und Florida Clade 2) teilte, welche repräsentiert werden von *A/equine/SouthAfrica/4/2003* und *A/equine/Richmond/1/07* (BRYANT et al., 2009; LEWIS et al., 2011; OIE, 2016).

### 2.2.2. Epidemiologie

Florida Clade 1 und Florida Clade 2 sind derzeit die weltweit überwiegend zirkulierenden und nachgewiesenen Stämme. Aufgrund des Transports von subklinisch infizierten geimpften Pferden und nicht Einhalten der Quarantänebedingungen führten beide Clades zu großen Ausbrüchen in den letzten 10 Jahren. Florida Clade 2 wurde hauptsächlich in Europa isoliert, führte aber auch zu Ausbrüchen in Asien (QUI et al., 2010; VIRMANI et al., 2010; YONDON et al., 2013), und Florida Clade 1 meist in Amerika, führte aber auch zu Ausbrüchen in Afrika, Asien und Australien, allerdings Länder in denen die Influenza-Impfung bei den Pferden unüblich oder sogar verboten war (GAGNON et al., 2007; DAMIANI et al., 2008; KING et al., 2004; YAMANAKA et al., 2008; WATSON et al., 2011), sowie in Europa (BRYANT et al., 2011; GILDEA et al., 2012).

Zu den größten Ausbrüchen der letzten Jahre zählen der Ausbruch von equinem Influenzavirus in Großbritannien im Jahr 2003 (Clade 2), Japan und Australien im Jahr 2007 (Clade 1), Indien im Jahr 2009 (Clade 2), Mongolei und China in den Jahren 2008 bis 2009 (Clade 2), in Südamerika im Jahr 2012 (Clade 1), in Großbritannien in den Jahren 2013- 2015 (Clade 2) und in Brasilien im Jahr 2015 (Clade 1) (NEWTON et al., 2006; CALLINAN, 2008; ITO et al., 2008; YAMANAKA et al., 2008; VIRMANI et al., 2010; WOODWARD et al., 2014; RASH et al., 2017; FAVARO et al., 2017).

Der häufigste Übertragungsmechanismus ist erwiesenermaßen die Tröpfcheninfektion. Der Virus ist hochansteckend und kann über direkten Kontakt der Pferde, Personen, Gegenstände im Stall, Wasser und Futter, sowie auch über Aerosole und Wind übertragen werden. Influenzaviren sind sehr empfindlich und können durch Hitze und Desinfektionsmittel abgetötet werden (MYERS et al., 2006), können jedoch bis zu zwei Wochen lang bei relativ hoher Temperatur in z.B.

verschmutztem Wasser persistieren (MUMFORD, 2011). Ebenso kann das Virus ultraviolettem Licht nicht standhalten (YADAV et al., 1993).

Alle Pferde können infiziert werden, unabhängig von Alter, Geschlecht oder Rasse. Die Infektion ist auch saisonunabhängig, jedoch wird angenommen, dass Pferde im Winter, wenn sie im Stall sind und auf engem und geschlossenem Raum leben, schneller erkranken und das Virus sich schneller ausbreitet (MYERS et al., 2006). Die Morbiditätsrate in Pferdebeständen kann bis zu 100% sein, wobei die Mortalitätsrate sehr gering ist (VAN MAANEN et al., 2002).

Ausbrüche von equiner Influenza wurden weltweit schon fast in jedem Land beschrieben, mit der Ausnahme von Neuseeland und Island. Meist werden diese Ausbrüche wie bereits erwähnt mit dem Transport der Tiere, inadäquater Quarantäne und dem Einbringen neuer Pferde in eine Population assoziiert (BRYANT et al., 2009), wobei es sich hier oft um seronegative Pferde handelt (WOOD, 1991). Diese sind wahrscheinlich also nicht die Quelle des Virus, können dieses aber vermehren und ausscheiden. Der Verlauf bzw. der Schweregrad der Krankheit ist abhängig vom Immunstatus der Pferde zum Zeitpunkt des Kontaktes mit dem Virus, ihrem Umfeld und dem Stress, dem die Pferde zum Zeitpunkt der Infektion unterliegen (GROSS et al., 1998; MORLEY et al., 1998; GILDEA et al., 2011a). Ebenso sind junge Pferde mit niedrigem Antikörpertiter aufgrund der geringeren Anzahl an Impfdosen und Pferde, die aufgrund von Transporten oft mit anderen Pferden in Kontakt treten, am anfälligsten (NEWTON et al., 1999; PARK et al., 2004). Das Virus bleibt nicht in erkrankten Pferden nach der Genesung weiterhin bestehen. Man nimmt an, dass es in endemischen Populationen geringgradig weiterhin existiert und zu gelegentlichen Ausbrüchen führen kann (GLASS et al., 2002). In Ländern, in denen die equine Influenza nicht endemisch ist, wird vermutet, dass diese auch nach sporadischen Ausbrüchen wieder Influenza-frei sind. Nach dem Ausbruch in Australien 2007 wurde das Virus innerhalb von 4 Monaten nach einem extensiven Kontrollprogramm wieder ausgeremert (GARNER et al., 2011).

### 2.2.3. Pathogenese

Nachdem das Influenzavirus in den Atmungsstrakt gelangt, wird es von den Glykoproteinen und den Mukopolysachhariden des Schleims der Mukosa in die

Schleimschicht eingebettet, sodass es nicht bis zur Epithelzelle gelangt. Ist die Virusdosis aber dementsprechend hoch, kann die virale Neuraminidase die Schleimschicht dementsprechend penetrieren und das Virus hat Zugang zu den Epithelzellen des Atmungstraktes. Daraufhin kann das Virus durch Endozytose in die Wirtszelle eindringen, nachdem es das Hämagglutinin an den Sialinsäurerezeptor an den Epithelzellen bindet (BEECH, 1991). Nach dem Eindringen des Influenzavirus in die Wirtszelle wandern die viralen Ribonukleoproteine in den Nukleus, um dort die mRNA und cRNA zu generieren (RESA-INFANTE et al., 2011). Die cRNA wird nun als Vorlage für die Produktion weiterer viraler RNAs verwendet, welche dann anschließend in das Zytoplasma transportiert werden, wo sie nach Implementierung weiterer viraler Partikel, aus der Zelle ausgeschleust werden. Diese Replikation im Zellkern ist eigentlich sehr untypisch für RNA-Viren (HAY et al., 1977). Man vermutet, dass dies auf das NS1 Protein zurückzuführen ist. Das NS1 kann zelluläre und virale Prozesse im Zuge einer Influenzainfektion beeinflussen und spielt eine wichtige Rolle als Virulenzfaktor (GEISS et al., 2002; SOLORZANO et al., 2005). Es ermöglicht die virale Replikation, indem es in die RNA-Synthese der Wirtszelle eingreift und durch verschiedene Mechanismen die virale RNA-Transkription begünstigt (ARAGON et al., 2000; HALE et al., 2008). Das Virus kann sich nun entlang der Schleimhaut im respiratorischen Trakt des Tieres mit Hilfe der Ziliarbewegung innerhalb von drei Tagen, angefangen bei der Trachea bis über den Bronchialbaum hinaus ausbreiten und weitere Epithelzellen befallen (MYERS et al., 2006).

#### 2.2.4. Klinik

Die Inkubationszeit kann unter 24 Stunden sein (VAN MAANEN et al., 2002) und verläuft umgekehrt proportional zur Virusdosis (MUMFORD et al., 1990). Die typischen Symptome einer Infektion sind: Fieber bis zu 42°C, rauher bzw. trockener Husten, seröser bis mukopurulenter Nasenausfluss, vergrößerte Mandibularlymphknoten, Lethargie und Anorexie. Ebenso kann es zu inspiratorischen und expiratorischen vesikulären Atemgeräuschen kommen, Ödeme und Schmerzen an den Gliedmaßen, Epiphora und einer Hyperämie der Maul- und Nasenschleimhäute. Es kann sogar bis zur Nekrose des Bronchiolarepithels kommen. Die lokalen Symptome lassen sich auf

die Zerstörung des Epithels und die systemischen Anzeichen auf die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen im Zuge der Entzündung zurückführen (CULLINANE et al., 2013; MYERS et al., 2006). Die verschiedenen Stämme des equinen Influenzavirus locken unterschiedliche proinflammatorische Zytokine (wie Interferone oder Interleukine) an (WATTRANG et al., 2003). Leukopenie, Anämie und Lymphopenie sind nicht spezifische, aber möglicherweise nachzuweisende hämatologische Anzeichen. Trächtige Stuten können in Ausnahmefällen abortieren oder resorbieren, aber eher aufgrund des hohen Fiebers und nicht wegen der viralen Erkrankung (CULLINANE et al., 2013; MYERS et al., 2006). Bei jungen Fohlen, die nicht mit maternalen Antikörpern versorgt waren, sind fatale Fälle beschrieben, die mit einer bronchointerstitiellen Pneumonie einhergehen. Diese Pneumonie charakterisiert sich durch eine squamöse Metaplasie des bronchialen Epithels und einer Nekrose des Alveolarepithels zusammen mit einer neutrophilen Infiltration (PATTERSON-KANE et al., 2008). Neurologische Ausfälle und Enteritis sind in Zusammenhang mit Influenza äußerst selten beschrieben, deshalb nicht weiter zu beachten (WEBSTER et al., 1991; DALY et al., 2006). Erkrankte Tiere können sich wieder erholen und die Symptome bleiben zur Gänze aus. Unvollständig immunisierte Tiere zeigen meist mildere Symptome, wie Nasenausfluss und leichten Husten (NEWTON et al., 2000a). Oft kommt es im Zuge einer Erkrankung zu einer sekundären bakteriellen Infektion, die mit dauerhaftem Fieber und Husten, purulentem Nasenausfluss, Pneumonie oder Pleuritis einhergeht (MYERS et al., 2006; CULLINANE et al., 2013).

#### 2.2.5. Diagnostik

Es muss in der Diagnostik von equinem Influenza prinzipiell die Erregeridentifikation von dem Nachweis der Immunantwort unterschieden werden.

Equines Influenza in einer geimpften Population zu diagnostizieren stellt sich als Herausforderung dar. Eine definitive Diagnose ist nur möglich durch Isolierung und Nachweis des Erregers aus einem Nasen-Rachen-Tupfer oder durch serologische Untersuchungen (MYERS et al., 2006; CULLINANE et al., 2013). Die Möglichkeiten der serologischen Untersuchung und der Nachweis einer Immunantwort sind ausführlich unter 2.3.4. beschrieben.

Immunologisch naive Tiere scheiden das Virus 7-10 Tage lang aus, wobei bereits immunisierte Tiere es nur 1-2 Tage lang ausscheiden (MUMFORD et al., 1994a,b). Die Tupfer werden optimalerweise sofort bei Verdacht auf Infektion, von so vielen Tieren wie wirtschaftlich möglich, unbedingt aber von den Tieren mit den auffälligsten Symptomen entnommen und sofort beprobt, um etwaige Maßnahmen unmittelbar durchführen zu können (MYERS et al., 2006). Die gängigsten Diagnostiktechniken, um equines Influenzavirus nachzuweisen sind Virusisolation VI, ELISA, RT-PCR und Directigen Flu A-DFA. Die Virusisolation wurde von RT-PCR (Nachweis viraler Nukleinsäure) und ELISA (Nachweis der Nukleoproteine) in vielen Fällen abgelöst. RT-PCR ist das Mittel der Wahl in vielen Laboren, da der Test sehr schnell und sehr sensitiv ist (QUINLIVAN et al., 2004,2005a; LU et al., 2009; KIRKLAND et al., 2011). RT-PCR- Kits für equines Influenza sind auch kommerziell erhältlich.

Antigennachweis mit ELISA kann man mit den in der Humanmedizin verwendeten Kits zum Nachweis der humanen Influenza durchführen (CHAMBERS et al., 1994; YAMANAKA et al., 2008). Diese Kits werden auch RAD-Kits (Rapid Antigen Detection) genannt und sind leicht anzuwenden und auch sehr schnell, allerdings sind sie nicht so sensitiv wie die RT-PCR (QUINLIVAN et al., 2004,2005; YAMANAKA et al., 2008). Die Virusisolation ist zwar nicht so sensitiv wie ELISA und RT-PCR, jedoch außerordentlich wichtig für die Charakterisierung des Virus und die Überwachung der zirkulierenden Stämme. Meist wird das Virus hierfür in embryonierten Hühnereiern oder in Madin Darby Canine Kidney-Zelllinien angezüchtet (AESCHBACHER et al., 2014).

Der DFA ist ein chromatographischer Immunoassay Test, ebenfalls ein RAD-Kit, welcher in einer 2014 publizierten Studie als sehr sensitiv in der Diagnose des equinen Influenzavirus beschrieben wird (GALVIN et al., 2014).

Um bei einem Ausbruch festzustellen, welche einzelnen Individuen betroffen sind, ist die serologische Methode das Mittel der Wahl, auch wenn nur eine retrospektive Diagnose möglich ist.

Differentialdiagnostisch muss bei respiratorischen, infektiösen Erkrankungen auch an equine Herpesviren 1 und 4, equine Rhinitis und Streptokokkeninfektionen gedacht werden (CULLINANE et al., 2013).

### 2.2.6. Therapie

Die Therapie der equinen Influenza erfolgt hauptsächlich symptomatisch. Antibiotika sind nur dann anzuwenden, wenn der Verdacht einer sekundären bakteriellen Infektion besteht. Die Gabe von NSAIDs um das Fieber zu senken, kann indiziert sein, um das Allgemeinbefinden der Pferde zu verbessern (WILSON, 1993). Immunstimulanzien, Antitussiva oder Bronchodilatoren sind zu vernachlässigen, da das Abhusten von Viruspartikeln von Vorteil ist und die Patienten keine signifikante Bronchokonstriktion aufweisen (WILSON, 1993; KASTNER et al., 1999). Es wird empfohlen, Virostatika wie z.B. Amantadin, bei bestehender Gefahr der Infektion eines Pferdes bereits vor der Infektion prophylaktisch zu verabreichen. Sollte ein Pferd mit einem bekannt infizierten Pferd in Kontakt treten, sollte die innere Körpertemperatur mehrmals täglich kontrolliert werden und eine prophylaktische Therapie kann angedacht werden (MYERS et al., 2006).

Das Management im Falle eines Ausbruchs ist in diesem Fall von mehr Bedeutung als die Therapie jedes einzelnen Individuums.

Betroffene Tiere müssen strikte Stallruhe einhalten, und eine nicht publizierte, aber bekannte Empfehlung besagt, dass die Pferde mindestens eine Woche Stallruhe für jeden Tag, an dem sie Fieber hatten, benötigen. Also wenn z.B. das Pferd fünf Tage lang Fieber nach der Infektion hatte, muss es fünf Wochen lang Boxenruhe einhalten. Die Regeneration des respiratorischen Epithels kann also Wochen dauern, auch wenn es zu keinen Komplikationen oder sekundären Erkrankungen kommt (WILLOUGHBY et al., 1992). Wenn diese Zeit nicht eingehalten wird, kann es zu dauerhaften Erkrankungen wie Myokarditits oder equinem Asthma kommen (MYERS et al., 2006). Pferde, die klinische Anzeichen einer Influenza zeigen, werden am besten schon vor der definitiven Diagnose isoliert. Nach der Isolierung aller betroffenen Tiere erfolgt im besten Falle eine schnelle Diagnose und weitere Quarantänemaßnahmen wie ein Transportverbot von Pferden (GILDEA et al., 2011c). Eine Influenza-Impfung aller Pferde im betroffenen Gebiet unmittelbar nach dem Ausbruch ist indiziert und gehört zum Standardmanagement (BARQUERO et al., 2007; GILDEA et al., 2011c).

### 2.2.7. Prophylaxe

In einem Land, in dem equine Influenza endemisch ist, werden die Isolation und die klinische Untersuchung von neuen Pferden, die in eine Population eingegliedert werden sollen, empfohlen, ebenso wie die serologische Untersuchung und gegebenenfalls eine adäquate Vakzinierung der Pferde. Weiterhin sollte dann eine Boosterimpfung alle 6 Monate stattfinden, insbesondere bei jungen Pferden. Wichtig ist auch die strikte Abgrenzung von Geländen, auf denen Pferde ein- und ausgehen (GILDEA et al., 2011c). In nicht endemischen Ländern, wie z.B. Neuseeland oder Australien, wird auf die Impfung der importierten Pferde vertraut und diese müssen zuerst in Quarantäne, um die Pferdepopulation in ihrem Land zu schützen. Impfung der eigenen Tiere ist in diesen Ländern nur erlaubt in bestimmten Fällen, wie z.B. der Export des Tieres in ein endemisches Land (GARNER et al., 2011).

Vakzinierung ist ein grundlegender Bestandteil der weltweiten Kontrolle der equinen Influenza. Viele Länder haben strikte Impfvorgaben für mobile Pferde und solche die an Rennen oder Turnieren teilnehmen. Eine Expertentruppe der OIE veranlasst jährlich weltweit phylogenetische und antigene Untersuchungen der equinen Influenzaviren von bekannten Ausbrüchen, um immer die aktuell zirkulierenden Stämme zu überwachen und adäquate Impfeempfehlungen abgeben zu können (PERGLIONE et al., 2015).

Auf die Grundlagen der Vakzinierung und die anerkannten Empfehlungen wird nun genauer im Unterpunkt 2.3. dieser Arbeit eingegangen.

## 2.3. Immunologie

### 2.3.1. Grundlagen der Immunantwort und Antikörperbildung nach Influenzainfektionen beim Pferd

Nach der Infektion eines Individuums reagiert zuerst dessen angeborenes Immunsystem. Das angeborene Immunsystem erkennt sogenannte PAMPs (pathogen associated molecular pattern) mit Hilfe seiner dendritischen Zellen und Makrophagen (SI-TAHAR et al., 2009). Das Pathogen wird durch Phagozytose ins Phagosom aufgenommen. Hier kann es nach Fusion mit den Lysosomen angesäuert werden und durch Enzyme dieses Lysosoms oder toxische Substanzen abgetötet werden. Die

Aufgabe der dendritischen Zellen ist es, das Antigen den T-Lymphozyten in den peripheren Lymphknoten zu präsentieren. Diese abgetöteten Pathogene, welche intravesikuläre Antigene sind, werden an der Zelloberfläche durch Bindung an die MHC-II-Moleküle präsentiert (JANEWAY et al., 2005).

Es kommt zur Sezernierung antiviraler Zytokine, insbesondere Interleukine und Interferone. Influenza A Viren veranlassen vor allem die Synthese von  $IFN\alpha$  und  $IFN\beta$  (MARCUS et al., 2005) und sind in der Lage, mit Hilfe ihres NS1 Proteins sich selbst zu maskieren und somit die Immunantwort durch verschiedene Mechanismen zu unterdrücken (GARCÍA-SASTRE et al., 1998; FERNANDEZ-SESMA, 2006; HALE et al., 2008).

Das adaptive Immunsystem reagiert nach einer Infektion mit Bildung neutralisierender Antikörper und Vermehrung zytotoxischer T- Zellen, folglich sowohl mit einer humoralen, als auch mit einer zellulären Immunantwort (SLATER et al., 2000; MURASKO et al., 2002). Die humorale Immunantwort wird (nach Bindung an die MHC-II-Moleküle) von den  $CD4^+$ -Zellen verstärkt und es kommt zur Bildung neutralisierender Antikörper, welche vor allem gegen das HA gerichtet sind (MARTINEZ et al., 2009). Dies erfolgt, indem die  $CD4^+$ -Zellen Zytokine sezernieren, die die Bildung dieser Antikörper in den B-Zellen aktiviert (HANNANT et al., 1989; MOSS, 2003). Die gebildeten Antikörper gegen das NA minimieren die Ausbreitung des Virus, schützen jedoch nicht vor Infektionen (HAMPSON et al., 2006). Die ausgebildeten spezifischen IgGa und IgGb gelten als schützend, wohingegen die Produktion von IgG(T) als nicht-schützende Immunantwort gilt (NELSON et al., 1998). Vermehrt sich das Virus im Zytosol seiner infizierten Zelle und kommt es anschließend zur Bindung dieser zerlegten viraler Peptidfragmente an MHC-I-Moleküle, werden diese ebenfalls an der Zelloberfläche präsentiert und es kommt zur Bildung der  $CD8^+$ -zytotoxischen T-Lymphozyten. Diese lösen einen programmierten Zelltod aus und verhindern so, dass bereits fertige oder annähernd fertige Viren freigesetzt werden und andere Zellen infizieren können (PARDO et al., 2009).

### 2.3.2. Technologie von Influenza-Impfstoffen und die dadurch induzierte Immunantwort

Es wird im folgenden Abschnitt nur auf die für diese Studie angewendeten Impfstoffe eingegangen. Diese sind in Europa zugelassene und verwendete Impfstoffe. Es handelt sich bei allen drei Impfstoffen um kombinierte Influenza-Tetanusimpfstoffe für Pferde. Es bestehen keine Hinweise, dass sich die Kombination dieser beiden Komponenten (Influenza und Tetanus) in einem Impfstoff auf die Immunreaktion auswirkt (MUMFORD et al., 1994c). An dieser Stelle wäre auch anzumerken, dass sich die zeitgleiche Impfung von Pferden gegen Influenza und equines Herpesvirus 1/4 positiv auf die Immunantwort der Influenzaimpfung auswirkt. Die Antikörpertiter gegen Influenzaviren sind laut einer im Jahr 2016 publizierten Studie höher in Pferden, die eine zeitgleiche Impfung der beiden Impfstoffe erhalten haben und die humorale Immunantwort gegen die Herpesviren wird dadurch nicht beeinträchtigt (GILDEA et al., 2016). In Tabelle 1 findet man die Impfstoffe, die in dieser Arbeit genauer beschrieben werden.

Tabelle 1: Details der hier eingesetzten Influenza-Tetanus Impfstoffe

Impfstoff Hersteller	Typ	Adjuvantien	Stamm	Subtyp	Linie
Duvaxyn IE-T Plus (Elanco) <sup>®</sup>	Inaktiviertes Ganzpartikelvirus	Carbomer Al(OH) <sub>3</sub>	A/eq/Prague/56	H7N7	-
			A/eq/Suffolk/89	H3N8	AM
			A/eq/Newmarket/1/93	H3N8	EU
Equip FT (Zoetis) <sup>®</sup>	Subunit	ISCOM	A/eq/Newmarket/77	H7N7	-
			A/eq/Kentucky/98	H3N8	AM
			A/eq/Borlange/91	H3N8	EU
ProteqFlu TE (Merial) <sup>®</sup>	Kanarienvox- Rekombinante	Carbomer	A/eq/Ohio/03	H3N8	AM
			A/eq/Richmond/1/07	H3N8	EU

Legende: Al(OH)<sub>3</sub>: Aluminiumhydroxid, AM: American, EU: European, eq: equine, ISCOM: Immune Stimulating Complexes

Alle hier verwendeten Impfstoffe enthalten den Influenza-H3N8-Subtyp. Duvaxyn IE T-Plus<sup>®</sup> und Equip FT<sup>®</sup> enthalten beide noch einen H7N7-Subtyp, obwohl dieser schon für erloschen gehalten wird und die OIE einen Impfstoff, der den H7N7-Subtyp enthält, nicht mehr empfiehlt (WEBSTER 1993; CULLINANE et al., 2010). Equip FT<sup>®</sup> enthält einen Immunostimulating Complex (ISCOM) als Adjuvans. ISCOM Partikel sind negativ geladene und stabile, käfigähnliche Strukturen aus Antigenen (SJOLANDER et al., 1998). Die Antigene werden sowohl endogen als auch exogen verarbeitet und über MHC I und MHC II Moleküle präsentiert (MOREIN et al., 1999). ISCOMs induzieren auch die Synthese von Zytokinen, welche die Reaktion der T-Lymphozyten moduliert (SJOLANDER et al., 1998; SJOLANDER et al., 1999). Die zelluläre Immunantwort ist wichtig für die Eliminierung der infizierten Zellen, jedoch erweist sich diese als schwierig nachzuweisen. Es hat sich herausgestellt, dass der Nachweis der Synthese von Interferon $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) als Hilfsmittel zum Nachweis einer zellulären Immunantwort beim Pferd verwendet werden kann (PAILLOT et al., 2007). Die Synthese von IFN $\gamma$  wurde bereits in Pferden nach Immunisierung mit einem Kanarienvirus-Impfstoff, einem ISCOM-basierten Impfstoff und einem inaktivierten Ganzpartikel-Impfstoff nachgewiesen und somit die zelluläre Immunantwort nach der Impfung bestätigt (PAILLOT et al., 2006; PAILLOT et al., 2007; PAILLOT et al., 2008; PAILLOT et al., 2012; PAILLOT et al., 2013). Bei Duvaxyn IE T Plus<sup>®</sup> handelt sich um eine inaktivierte, wässrige Suspension. Duvaxyn ist ein inaktivierter Ganzpartikelimpfstoff, der keine replikationsfähigen Pathogene beinhaltet. Es kommt zur Ausbildung einer aktiven Immunisierung, indem eine primäre Immunantwort durch erregerspezifische Prägung immunkompetenter Lymphozyten folgt (Angabe vom Impfstoffhersteller). ProteqFlu Te<sup>®</sup> ist der einzige dieser drei Impfstoffe, der die aktuell repräsentativen Stämme beinhaltet, wie in Tabelle 1 zu erkennen ist. Die OIE-Expertengruppe, die jährlich die Evolution des equinen Influenzavirus überwacht und dokumentiert, empfiehlt seit 2010 einen Impfstoff, der sowohl die Clade 1-, als auch Clade 2-Linie enthält und an die momentan zirkulierenden Stämme angepasst ist. Diesen Anforderungen entspricht ProteqFlu TE<sup>®</sup> (OIE, 2014; PAILLOT et al., 2016). Je größer der Unterschied bzw. die Nichtübereinstimmung des Stammes im verwendeten Impfstoff und des zirkulierenden

Stammes in den Pferden ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit einer Infektion (ELTON et al., 2013). Obwohl eine Wirksamkeit der Impfstoffe, die nicht die aktuell repräsentativen Stämme beinhalten, am Einzeltier nachgewiesen wurde, besteht ein erhöhtes Risiko eines epidemischen Ausbruches in einer Population bei Verwendung eines solchen Impfstoffes (DALY et al., 2013). Impfstoffe sollten also Stämme enthalten, die antigenen den zirkulierenden Stämmen entsprechen, um einen optimalen Schutz zu gewährleisten. Diese müssen daher zeitnah immer wieder angepasst werden (GILDEA et al., 2013). Proteq Flu Te<sup>®</sup> enthält zwei Influenzastämme, die in zwei Kanarienspockenvektoren (Trägerviren) eingesetzt wurden, um die HA-Gene dieser beiden Stämme, A/eq/OHIO/03 und A/eq/RICHMOND/1/07, zu exprimieren. Nach der Impfung kann das Kanarienspockenvirus in die Wirtszelle eindringen und das HA an der Oberfläche dieser Zellen präsentieren. Dieser endogene Weg der Infektion, ahmt eine natürliche Infektion nach und eine humorale und zelluläre Immunantwort folgen (PAILLOT et al., 2006).

### 2.3.3. Immunantwort und Antikörpertiterverlauf nach Influenzaimpfungen

Es gibt viele Faktoren, die die Wirksamkeit einer Impfung beeinflussen: das Management bzw. der Zeitpunkt der Impfung, der Immunstatus des Tieres sowie die antigenen Eigenschaften und Adjuvantien des Impfstoffes (CULLINANE et al., 2001). Eine effektive Impfung sollte das Tier sowohl klinisch als auch virologisch vor der Erkrankung schützen, also das Tier sollte nach der Impfung weder erkranken, noch das Virus ausscheiden. Der Schutz vor Virusausscheidung korreliert mit der antigenen Ähnlichkeit des Impfstoffes und des zirkulierenden Virus (PARK et al., 2004). Generell haben mehrere Studien gezeigt, dass der Antikörpertiter-Peak nach einer Booster-Impfung zwischen zwei und vier Wochen nach der Impfung stattfindet und dass es keine signifikanten Unterschiede in der generellen Immunantwort zwischen den kommerziell erhältlichen Impfstoffen gegen Influenza gibt. Die Antikörper sinken signifikant drei Monate nach der Impfung und erreichen den Ausgangswert (wie vor der Impfung) ca. nach sechs Monaten (GILDEA et al., 2011a,b). Hier wäre noch anzumerken, dass der Antikörper-Peak nach der Impfung mit einem Kanarienspox-Impfstoff später eintritt als bei anderen Impfstoffen, wie z.B. einem ISCOM-Impfstoff oder einem inaktivierten Ganzpartikelimpfstoff (GILDEA et al., 2011a,b). Darüber

hinaus sind längere Intervalle zwischen den Booster-Impfungen bei älteren Pferden mit einer bereits langen Impfhistorie notwendig, im Gegensatz zu jüngeren Pferden, die noch kürzere Intervalle benötigen (GILDEA et al., 2011a,b).

Stuten sollten in den letzten 4-6 Wochen der Trächtigkeit gegen Influenza geimpft werden, damit das Vorhandensein von Antikörpern im Kolostrum sichergestellt wird. Fohlen erhalten so passiv maternale Antikörper und gelten als geschützt. Sie sollten solange nicht selbst geimpft werden, bis die maternalen Antikörper verschwinden, was ca. mit 6 Monaten der Fall ist (CULLINANE et al., 2001; WILSON et al., 2001).

Je nach Vorgabe der Impfstoffhersteller beginnt die Immunisierung mit der ersten Impfung der Grundimmunisierung, gefolgt von einer zweiten Impfung nach 3-12 Wochen und der dritten Impfung der Grundimmunisierung, bzw. die erste Booster-Impfung 5-7 Monate nach der zweiten Impfung. Danach erfolgen jährliche oder halbjährliche Booster-Impfungen. Auf die Vorgaben der verschiedenen Gremien bzw. der Impfstoffhersteller wird genauer unter 2.4. eingegangen.

Eine Grundimmunisierung ist notwendig, da Pferde nicht ausreichend auf die erste Impfdosis reagieren (VAN OIRSCHOT et al., 1991; VAN MAANEN et al., 1992). Nach der zweiten Impfstoffdosis zeigen die Pferde zwar eine Immunantwort, die Antikörpertiter fallen allerdings 4 Monate nach der Impfung auf ihren Ausgangswert zurück. Erst die dritte Impfung, 6 Monate nach der ersten Impfung, führt zu einer ausreichend starken Immunantwort (CULLINANE et al., 2001). Der Antikörpertiter nicht-immunisierter Pferde ist nach den ersten beiden Impfungen im Zuge der Grundimmunisierung sehr gering und die Pferde sind im Zeitraum nach der zweiten Impfung und vor der dritten Impfung kaum vor einer Infektion geschützt. Dies ist die sogenannte „Immunitätslücke“. Eine zusätzliche Impfung in diesem beschriebenen Zeitraum der Immunitätslücke sollte angedacht werden (CULLINANE et al., 2001). Verlängerte Zeitintervalle zwischen den Impfungen der Grundimmunisierung und den Booster-Impfungen erhöhen das Risiko einer Infektion, auch wenn es die Impfstoffhersteller oder Gremien nicht anders vorschreiben (CULLINANE et al., 2014).

#### 2.3.4. Nachweismethoden von Antikörpern

Der serologische Nachweis von Antikörpern erfolgt üblicherweise durch einen SRH-Test (Single Radial Haemolysis) oder HI-Test (Haemagglutinin-Inhibition). HI-Tests sind einfacher anzuwenden und die Ergebnisse schneller verfügbar. SRH-Tests werden in spezialisierten Laboren durchgeführt und mit Ergebnissen ist später zu rechnen. Zusätzlich kann der HI-Test auch genutzt werden, ohne ein vorhandenes, isoliertes Virus von einem infizierten Pferd nach Serokonversion, weil man hierbei auch mit einem Referenzvirus arbeiten kann (GALVIN et al., 2013). Studien belegen aber, dass sich der SRH-Test zur Detektion von Influenzavirus-Antikörpern, in unterschiedlichen Laboren besser reproduzieren lässt als der HI-Test (MUMFORD et al., 2000; DALY et al., 2007a). Die Vorgehensweise bei der Durchführung eines SRH-Tests ist unter 3.2.3. nachzulesen. Die nachgewiesenen Antikörper beim SRH-Test korrelieren mit dem erhaltenen Schutz gegen ein antigenisch gleiches Virus nach der Impfung. Pferde mit einem SRH-Wert über 150 mm<sup>2</sup> oder höher gelten als virologisch geschützt und Pferde mit einem SRH-Wert von 85 mm<sup>2</sup> oder höher gelten als klinisch geschützt (MUMFORD et al., 1992a, 1994a,b; MUMFORD, 2001). Haben Pferde einen SRH-Wert unter 50 mm<sup>2</sup>, sind diese nicht vor einer Infektion geschützt und stellen ein großes Risiko für andere Pferde dar (WOOD, 1991). Der SRH-Test wird häufig eingesetzt, um den Immunstatus eines Pferdes, den Impferfolg nach einer Vakzinierung, und die Dauer des Impfschutzes nachzuweisen (DALY et al., 2007a; PAILLOT et al., 2010, 2013; EL-HAGE et al., 2013).

Nachdem viele Pferde bereits geimpft wurden oder mit dem Virus in Kontakt waren, stellt die Analyse der Antikörper einer einzigen Probe keine definitive Diagnose dar. Ein Anstieg des Antikörpertiters beim paarweisen Vergleich von Serumproben kann besser Auskunft geben, ob eine Infektion stattgefunden hat (GALVIN et al., 2013).

Es gibt auch einen ELISA (ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY) für die Detektion von Antikörpern gegen das Influenzavirus-Nukleoprotein. Der ELISA kann die Antikörper nach einer Impfung mit einem rekombinanten Kanarienvirus-Impfstoff nicht erkennen, da dieser nur die HA-Gene von den zwei Influenzastämmen exprimiert. Der ELISA ist zwar nicht so sensitiv, wie SRH- oder HI-Tests, aber er ist in der Lage, zwischen Antikörpern nach einer Impfung mit jenem Impfstoff und

Antikörpern nach natürlicher Infektion zu differenzieren (DIVA: differentiate between infected and vaccinated horses). Dieses Phänomen wird im Influenza-Überwachungsprogramm in Kombination mit dem Kanarienspocken-Impfstoff genutzt (GALVIN et al., 2013).

#### 2.4. Impfvorgaben verschiedener Gremien im Reitsport und Anwendungsempfehlungen der Impfstoffhersteller

Die unterschiedlichen Gremien im Reitsport bzw. der Tiergesundheit haben auch unterschiedliche Empfehlungen bzw. Vorschriften bezüglich der Impfung von Pferden gegen equines Influenza. In Tabelle 2 sind diese Empfehlungen zusammengefasst. Ebenso haben auch die verschiedenen Impfstoffhersteller, abhängig von ihrer Technologie, unterschiedliche Anwendungshinweise, welche in Tabelle 3 aufgelistet wurden.

Die Ständige Impfkommission Veterinärmedizin am Friedrich-Loeffler-Institut (StiKo Vet) in Deutschland empfiehlt eine halbjährliche Impfung zur Immunisierung von Pferden gegen equines Influenza. Dies gilt insbesondere für Pferde, die einem erhöhten Infektionsrisiko z.B. während Reitsportveranstaltungen ausgesetzt sind.

Tabelle 2: Impfempfehlungen verschiedener internationaler Gremien

		FEI	IFHA	OIE
Grundimmunisierung	1.Impfung	Impfung	Impfung	Impfung
	2.Impfung	21-92 d nach der 1. Impfung	2-4 Wochen nach der 1. Impfung	4 Wochen nach der 1. Impfung
	3.Impfung	Innerhalb von 7 Monaten nach der 2. Impfung		Innerhalb von 5 Monaten nach der 2. Impfung
Booster		alle 12 Monate	alle 12 Monate	alle 12 Monate
Booster vor Export/Event		Innerhalb der letzten 6 Monaten + 21d vor dem Export/ Event; mind. 7 d davor	Innerhalb der letzten 60 d vor dem Export/ Event; mind. 14 d davor	Innerhalb der letzten 90 d vor dem Event/ Transport; mind. 21 d davor

Tabelle 3: Empfehlungen zur Anwendung des Influenza-Impfstoffes der jeweiligen Hersteller

<p>DUVAXYN IET PLUS<sup>®</sup></p>	<p><b>Grundimmunisierung:</b> 3 Impfungen i.m.; erstmals im Alter von 5 Monaten, die Zweite 4– 6 Wochen danach, die Dritte nach weiteren 6 Monaten.</p> <p><b>Wiederholungsimpfung:</b> 1mal pro Jahr. Bei erhöhtem Infektionsdruck ist bei jungen Pferden die erste Wiederholungsimpfung bereits nach 6 Monaten anzuraten.</p> <p>Mindestalter: 5 Monate</p>
<p>EQUIP FT<sup>®</sup></p>	<p><b>Dosierung / Anwendung</b></p> <p>Eine ganze Impfdosis (2 ml) tief intramuskulär applizieren. Jungtiere können ab dem 3. - 4. Lebensmonat geimpft werden.</p> <p><b>Grundimmunisierung</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Impfung: eine Dosis (2 ml) Equip FT<sup>®</sup>.</li> <li>2. Impfung: 6 Wochen später eine Dosis (2 ml) Equip FT<sup>®</sup>.</li> </ol> <p><b>Boosterimpfungen</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Booster-Impfung: 5 Monate nach der 2. Impfung.</li> </ol> <p>Weitere Boosterimpfungen im Abstand von 12 bis 15 Monaten mit Equip F<sup>®</sup> oder Equip FT<sup>®</sup>.</p>
<p>PROTEQ FLU TE<sup>®</sup></p>	<p><b>Dosierung und Art der Anwendung</b></p> <p>Zur intramuskulären Anwendung.</p> <p><b>Grundimmunisierung:</b> erste Injektion ab einem Alter von 5-6 Monaten</p> <p><b>Wiederholungsimpfungen:</b></p> <p>Fünf Monate nach der Grundimmunisierung mit ProteqFlu-Te<sup>®</sup> danach: jährliche Injektion mit 1 Dosis, alternierend mit ProteqFlu<sup>®</sup> oder ProteqFlu-Te<sup>®</sup></p>

### 3. MATERIAL UND METHODE

#### 3.1. Tiere und Material

Es handelte sich bei der vorliegenden Arbeit um eine prospektive Blind-Studie (siehe 3.2.1), die beim Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern (LALLF M-V) angezeigt wurde. Das Aktenzeichen des bestätigten Tierversuchsvorhabens lautet: 7221.3-2-032/16.

##### 3.1.1. Versuchsaufbau kurz zusammengefasst

Insgesamt wurden 104 junge Sportpferde klinisch von einem Tierarzt untersucht und im Anschluss wurde ihnen intravenös Blut aus einer Jugularvene entnommen. Es wurden nur Pferde mit einem ungestörten Allgemeinzustand in die Studie miteingeschlossen. Unmittelbar danach wurden diese Pferde mit einem von drei in Europa zugelassenen kombinierten Influenza-Tetanusimpfstoffen intramuskulär geimpft. Diese Impfung erfolgte bei allen Pferden zu einem Termin, an dem diese regulär gegen Influenza geimpft werden mussten. Da es sich um eine Blindstudie handelte, war der untersuchende und impfende Tierarzt nicht darüber in Kenntnis gesetzt, welches Pferd welchen Impfstoff erhielt. Die Zuordnung der Pferde zu einem der drei Impfstoffe erfolgte randomisiert. Die ersten 35 Pferde, die geimpft wurden, erhielten Impfstoff 1, die nächsten 35 Pferde erhielten Impfstoff 2 und die letzten 35 Pferde erhielten Impfstoff 3. Es waren also jeweils 35 Pferde in einer Gruppe, die denselben Impfstoff erhielten. Die Probanden wurden an den darauffolgenden beiden Tagen ebenso klinisch von jenem Tierarzt untersucht und auch die Injektionsstelle wurde genau betrachtet, ob es zu eventuellen Veränderungen, wie z.B. Umfangsvermehrungen kam. Zusätzlich wurde das Allgemeinbefinden der Pferde von geschultem Stallpersonal mehrmals täglich überprüft, insbesondere etwaiges auffälliges Verhalten oder Gangbild wurden gemeldet und führten unmittelbar zu einer tierärztlichen Untersuchung des entsprechenden Pferdes. Es folgten weitere intravenöse Blutabnahmen jeweils 7, 14, 21, 55, 90, 121, 150, 180, 201 Tagen nach der Impfung. In einem geeigneten Labor wurde dann die Antikörperkonzentration der gewonnenen Blutproben untersucht.

### 3.1.2. Probanden

Die für die Studie verwendeten Pferde befanden sich alle auf Gestüt Lewitz in Mecklenburg-Vorpommern in Norddeutschland. Die Pferde wurden hier entweder in Boxen oder in Gruppen im Laufstall gehalten. Es handelte sich um junge Sportpferde zwischen 2 und 7 Jahren, die an den Umgang mit Menschen gewohnt waren. Das Management von Impfung und Entwurmung wurden streng überwacht und dokumentiert, sodass die Pferde alle regelmäßig geimpft und entwurmt wurden. Alle Pferde, die im Rahmen dieser Studie geimpft wurden, sind in Lewitz geboren und wurden von Beginn an nach demselben Impf- bzw. Entwurmungsplan behandelt. Mit ca. 6-8 Monaten erhielten die Pferde ihre erste equine Influenza-Tetanusvakzine (ITE), 2 Wochen später die erste equine Herpesimpfung (EHV 1,4), dann 2 Wochen darauf wieder ITE sowie nach weiteren 2 Wochen erneut eine Herpesimpfung. Die nächste Impfung erfolgte 6 Monate danach mit ITE- und EHV-Vakzine. Von nun an wurden die Pferde im halbjährlichen Rhythmus, wie von der FEI vorgeschrieben, sowohl ITE als auch EHV geimpft. Somit wurden alle Probanden grundimmunisiert und hatten schon mindestens 2 Wiederholungsimpfungen. Des Weiteren wurden alle Probanden als Fohlen alle 6-8 Wochen entwurmt, als Absetzer dann alle 2-3 Monate und als adulte Pferde 1-2 mal jährlich kurz vor der Impfung. Die verwendeten Wirkstoffe wechselten, je nach immer wieder durchgeführten Kotuntersuchungen, zwischen Pyrantel, Fenbendazol, Moxidectin und Ivermectin.

### 3.1.3. Gebrauchsmaterialien

Die detaillierten Angaben aller notwendigen Gebrauchsmaterialien sind im Anhang aufgelistet.

### 3.1.4. Angewandte Impfstoffe inklusive Technologie

Alle Informationen zu den einzelnen Impfstoffen wurden direkt vom Hersteller übernommen. Hierbei wäre auch kurz zu erwähnen, dass alle Pferde mit einem kombinierten Influenza-Tetanus-Impfstoff geimpft wurden, allerdings wird die Immunantwort der Pferde auf die Tetanuskomponente der Impfung nicht als Thema in dieser Arbeit behandelt. Da aber die meisten Pferde mit einem kombinierten Impfstoff

immunisiert werden und auch einige der Probanden ihren jährlichen Tetanusimpfschutz im Zuge der Studie erhalten mussten, wurde diese kombinierte Impfung für alle Pferde gewählt.

#### 3.1.4.1. Duyaxyn IE T Plus®

##### **Zusammensetzung**

Eine Impfstoffdosis (1,5 ml) enthält: jeweils inaktiviertes equines Influenzavirus

> 15 µg HA Stamm A/equi-1/Prag/56

> 15 µg HA Stamm A/equi-2/Newmarket 1/93

> 15 µg HA Stamm A/equi-2/Suffolk/89

≥ 150 I.E. Tetanustoxoid (gezüchtet auf embryonierten Hühnereiern)

##### **Hilfsstoffe**

Carbomer 941 4,0 mg

Al(OH)<sub>3</sub> 2,2 mg

##### **Vorsichtsmassnahmen**

Antiseptische Bedingungen sind zu beachten.

Die Pferde sollten vor, während und unmittelbar nach der Impfung keinem Stress ausgesetzt sein. Jeder Impfstoff kann vorübergehend lokale und/oder systemische Reaktionen auslösen. Meist haben lokale Reaktionen in Form von Schwellungen etwa einen Durchmesser von 5 cm und verschwinden 7- 10 Tage nach der Impfung.

##### **Hersteller**

Elanco, Greenfield, USA

#### 3.1.4.2. Equip FT®

ist ein polyvalenter ISCOM™-Split-Impfstoff. (ISCOM™= ImmunoStimulating Complex)

##### **Zusammensetzung**

1 Impfstoffdosis (2 ml) des inaktivierten ISCOM™-Impfstoffes enthält:

10 mcg Haemagglutinin Typ A (Equi 1/Newmarket 77)

1.4 mcg Haemagglutinin Typ A (Equi 2/Kentucky 98)

20 mcg Haemagglutinin Typ A (Equi 2/Borlange 91)

100 Lf Antigen. tetanic. et adsorbat.

### **Pharmazeutische Angaben**

Hilfsstoffe

*Heamagglutininae*

max. 580 mcg Quil A

max. 200 mcg Cholesterol

max. 200 mcg Phosphatidylcholin

Phosphatpuffer q.s.

*Tetanus-Toxoid*

Adsorbiert an max. 5.5 mg Aluminiumphosphat

### **Hersteller**

Zoetis, Inc., Florham Park, New Jersey, USA

#### 3.1.4.3. ProteqFlu TE<sup>®</sup>

##### **Arzneilich wirksame Bestandteile:**

≥ 5,3 log<sub>10</sub> Influenza A/equi-2/Ohio/03

Rekombinante des Kanarienspockenvirus (Stamm vCP2242)

≥ 5,3 log<sub>10</sub> Influenza A/equi-2/Richmond/1/07

Rekombinante des Kanarienspockenvirus (Stamm vCP3011)

Clostridium tetani-Toxoid

**Adjuvans:** Carbomer 4 mg

##### **Hersteller:**

Merial, Lyon, Frankreich

## 3.2. Methodik

### 3.2.1. Darstellung, Ablauf und Detailplan

Es wurden 104 Pferde mit in die Studie eingeschlossen, die zu einem regulären Zeitpunkt geimpft wurden. Diese Pferde wurden randomisiert in 3 Gruppen eingeteilt. Der untersuchende bzw. impfende Tierarzt war nicht über die Gruppeneinteilung informiert. Es handelt sich also um eine Blindstudie. Alle Pferde befanden sich in gutem Allgemeinzustand am Tag der Impfung. Zu Beginn der Studie wurden die Tiere

von einem Tierarzt klinisch untersucht, inklusive Messung der inneren Körpertemperatur (Details folgen unter 4.2.2.). War diese Untersuchung ohne besonderen Befund, wurde das Pferd in die Studie miteingeschlossen und es folgte eine intravenöse Blutabnahme von 10ml aus einer Jugularvene. Das frisch entnommene Vollblut wurde in Serumröhrchen mit Gerinnungsaktivator bei Raumtemperatur 5-6 Stunden warmgehalten und aufrecht in einem dafür vorgesehenen Röhrchenhalter aufbewahrt. Unmittelbar nach der Blutabnahme folgte eine tiefe intramuskuläre Injektion in die Halsmuskulatur mit einem der drei Influenza-Tetanusimpfstoffe. An den beiden darauffolgenden Tagen erfolgten eine Allgemeinuntersuchung mit Messung der IKT und eine detaillierte Betrachtung der Injektionsstelle. Von nun an folgten die weiteren intravenösen Blutabnahmen von jedem Pferd à 10 ml aus der Vena jugularis an jeweils 7, 14, 21, 55, 90, 121, 150, 180, 201 nach der Injektion. Insgesamt erfolgten also 10 Blutabnahmen pro Pferd im Verlauf der Studie. Sollte ein Pferd eine hochgradige Allgemeinstörung während der Studie zeigen, sollte dieses aus der Studie ausgeschlossen und dementsprechend veterinärmedizinisch betreut bzw. behandelt werden.

Das entnommene Blut wurde nach den beschriebenen 5 – 6 h im Serumröhrchen je 12 Minuten lang bei 5000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden je 2 ml des überstehenden Serums mit Einwegpipetten in wieder jeweils 2 verschiedene Eprouvetten abpipettiert. Die Eprouvetten wurden dann in geeigneten Gefrierschränken bei  $-18^{\circ}\text{Celsius}$  tiefgefroren und zwischengelagert. Die Eprouvetten wurden anschließend auf Trockeneis gelagert an das Irish Equine Centre in Johnstown (Irland) transportiert und dort serologisch ausgewertet. Alle Gebrauchsmaterialien zur Probenentnahme und Probenaufbereitung sind im Anhang aufgelistet.

### 3.2.2. Klinisch diagnostische Methode

Alle Pferde, die in die Studie miteinbezogen wurden, wurden vor Injektion des Impfstoffes bzw. der Blutabnahme von einem Tierarzt kontrolliert, untersucht und anhand der erläuterten Befunde in eine Kategorie zum Allgemeinbefinden eingeordnet. Die Kriterien der Kategoriezuteilung findet man in Tabelle 4. Zur Untersuchung gehörte unter anderem die Betrachtung und Beobachtung des Pferdes

als Ganzes in seiner gewohnten Umgebung, sowie Überprüfung von Nasenausfluss und der Mandibularlymphknoten, sowie eine Stauprobe der Jugularvenen. Jegliche weitere Veränderung im Gesundheitszustand der Pferde wurde dokumentiert. Zusätzlich wurde die innere Körpertemperatur rektal mit einem digitalen Thermometer gemessen. Jene Pferde, die eine Abweichung vom Normalbefund aufwiesen (siehe Tabelle 4), sind aus der Studie ausgeschlossen worden.

An den beiden Folgetagen nach der Impfung wurden die Pferde ebenfalls überprüft. Dabei wurde die Injektionsstelle genau betrachtet und die innere Körpertemperatur erneut gemessen. Sind Umfangsvermehrungen an der Injektionsstelle festgestellt worden, wurden diese mit einem Maßband vermessen und aufgezeichnet bzw. weiterhin beobachtet. Als lokale Reaktion wurde jegliche Art der Veränderung und Umfangsvermehrung an der Injektionsstelle betrachtet. Diese wurden auch auf Schmerzempfindlichkeit geprüft. Das Ausmaß der Umfangsvermehrungen war von „nicht messbar klein“ bzw. „nicht schmerzhaft bei Palpation“ bis hin zu 12 cm breiten, 10 cm hohen und 1 cm tiefen Umfangsvermehrungen, die auch bei der Palpation schmerzhaft waren. Ist ein Pferd nach der Impfung erkrankt oder zeigte ein gestörtes Allgemeinbefinden, welches der Kategorie 3 zuzuordnen war, wurde es aus der Studie ausgeschlossen und medizinisch betreut.

Tabelle 4: Ausschlußkriterien bei Auftreten von Komplikationen

Klinische Parameter	0 =	Keine Störung des Allgemeinbefindens
	1 =	Geringgradige Störung des Allgemeinbefindens, kein Fieber
	2 =	Mittelgradige Störung des Allgemeinbefindens, Fieber (>39,5°C)
	3 =	Hochgradige Störung des Allgemeinbefindens, Anorexie, Fieber (>40°C)
Befunde der Jugularvenen	0 =	Physiologisch
	1 =	Geringe subkutane Schwellung
	2 =	Mittelgradige subkutane Schwellung
	3 =	Thrombophlebitis

### 3.2.3. Serologische Methode

Als Methode wurde für die serologische Auswertung der Single Radial Haemolysis Test für equine Influenza angewendet. Dafür wurden zu Beginn je 150 µl von den Serumproben aus den 2ml-Eprouvetten in kleinere Eprouvetten, die für diesen Test notwendig sind, überführt. Da es sich um eine Blindstudie handelt wurde den Proben im Virologielabor eine neue Nummer randomisiert zugeteilt und mit dieser Nummer beschriftet. Zur optimalen Vorbereitung wurden die Serumproben inklusive eines negativen Kontrollserums bei 56°C (+/-1°C) 30 Minuten lang inaktiviert und anschließend bei 2-8°C gelagert.

Als Antigene wurde für Clade 1 mit SouthAfrica/4/03 und für Clade 2 mit Meath/1/07 gearbeitet.

#### **Testprozedur:**

##### ***Tag 1:***

Es wurden je 5 ml Schafsblut (SRBC – Sheep Red Blood Cells) in 1:1 Alseverscher Lösung (Schafsblut wurde innerhalb der letzten 2 Wochen vom Department of Agriculture in Irland entnommen und zur Verfügung gestellt) in zehn gleiche 20 ml Gefäße gefüllt und mit je 15 ml Hepes gepufferten Kochsalzlösung (HBS) aufgefüllt. Anschließend kamen die Gefäße für 10 Minuten bei 2000 rpm in die Zentrifuge. Dieser Vorgang wurde 3 mal wiederholt. Nach dem letzten „Waschvorgang“ wurde zu 5 der 10 Gefäße erneut 0,5 ml HBS zugegeben und das gesamte Blut in einem Gefäß gesammelt. Danach wurde von diesem Blut der Hämatokrit bemessen und wurde je nach Ergebnis durch erneute Beimengung von HBS auf einen exakten Hämatokrit von 8% gebracht. Das Blut wird dann bei 2-8°C über Nacht gelagert.

##### ***Tag 2:***

Vorbereitungen: Die zu verwendenden Petrischalen wurden beschriftet und im Inkubator gelagert. Eine 25 ml Pipette wurde in einem CO<sub>2</sub>- Inkubator bei 37°C (+/- 1°C) vorbereitet und je ein 20 ml Gefäß (für jede Petrischale ein Gefäß, je nachdem wieviele Proben auszuwerten sind) wurde in ein 43°C (+/-1°C) warmes Wasserbad positioniert.

Zu Beginn wurden je 3ml von dem am Vortag vorbereiteten Schafsblut in die 20 ml Gefäße pipettiert. Dann wurde die korrekte Dosis des Antigens (1,7 ml) hinzugefügt

und bei Zimmertemperatur 10 Minuten lang inkubiert. Die korrekte Dosis erhält man nach Optimierung der Antigenlösung.

Das Antigen wurde aus dem Nasenausfluss eines per RT-PCR diagnostiziertem mit equinem Influenza erkrankten Pferdes im Irish Equine Centre gewonnen. Das virushaltige Material wurde in die Allantoishöhle eines 9-12 Tage alten Hühnerembryos geimpft. Die Eier wurden für 48 Stunden bei 34°C (+/-1°C) inkubiert und anschließend vor der Antigenernte über Nacht bei 4°C (+/-1°C) gelagert. Die Hämagglutininaktivität der Allantoisflüssigkeit wurde an 1% Hühnererythrozyten in phosphatgepufferter Salzlösung getestet.

Nachdem die mit SRBC-gefüllten Gefäße 10 Minuten lang inkubiert wurden, wird nun langsam 2,35 ml CrCl<sub>3</sub> (Chromchlorid) beigemischt. Die Suspension wurde 5 Minuten lang bei Zimmertemperatur immer wieder geschüttelt und gedreht und anschließend bei 1500 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgekippt und mit Saline Hepes BovinesSerumAlbumin (BSA)-Lösung auf je 10 ml wieder aufgefüllt. Im Anschluss wurde die Suspension erneut bei 1500 rpm 5 Minuten lang zentrifugiert, der Überstand abgekippt und anschließend wurden 0,5 ml des SRH PBS (Single Radial Haemolysis phosphate buffered Saline) in die Hälfte der vorhandenen zu beprobenden Gefäße hinzugefügt und unmittelbar danach wurde der Inhalt aller 20 ml-Gefäße in ein großes Gefäß überführt. Man versicherte sich im Zuge dessen nochmal, ob der Rückstand aller Gefäße auch tatsächlich mitüberführt wurde, nach dem Motto „jede Zelle zählt“. Der Hämatokrit der erhaltenen Suspension wurde gemessen und wie bereits am Vortag durch Beimischung von HBS auf 8% gebracht. Die Lösung konnte nun für kurze Zeit bei 2-8°C gelagert werden.

Dieser Vorgang wurde für beide relevanten Antigene (Clade 1 und Clade 2) und eine Negativkontrolle angewendet.

Agarose wurde nach Laboranleitung und internationalen Standards hergestellt und in der Mikrowelle erhitzt bis eine homogene Flüssigkeit zu sehen ist. Es wurden je 13 ml der Agarose in die bereits im auf 43°C (+/-1°C) temperierten Wasserbad, vorgewärmten 20 ml Gefäße pipettiert und im Wasserbad stehen gelassen, um danach je 1,5 ml der Antigenlösung bzw. der Lösung der Negativkontrolle, der Agarose beizumengen. Vorsichtig wurden diese anschließend gewendet. Daraufhin wurden 0,5

ml der Komplementflüssigkeit (Meerschweinchenserum: Guinea-pig-serum-complement) hinzugefügt und wieder vorsichtig gewendet, um es danach gleich in die im Inkubator vorgewärmten Petrischalen zu gießen. Die Petrischalen wurden offen ca. 5 Minuten bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Dann wurden sie mit dem Deckel verschlossen und kopfüber bei 2-8°C gelagert.

Nach einer Vorlage wurden Löcher mit einem Durchmesser von 3 mm in den Agar gestanzt und die ausgestanzten Teile mit einer Vakuumpumpe abgesaugt. Zur Sicherstellung der wissenschaftlichen Arbeit trug jede Platte (Petrischale) eine negative Kontrolle (die im Irish Equine Centre davor durch zwei andere Methoden negativ getestet wurde) und eine EDQM positive Referenz, sowie pro 10 Platten eines Antigens, eine interne Referenz. Jeder SRH Test hatte somit 4 Kontrollen:

- Positive Kontrolle: EDQM-European Directorate for the Quality of Medicines (SouthAfrica03)
- Negative Kontrolle
- Internal Positive Control-IPC (Meath07)
- Kontrollplatte ohne Antigen für nichtspezifische Hämolyse

Sowie eine Limit of Detection Kontrolle (LOD): standardisiertes Serum mit wenig Antikörpern, um die Sensitivität des Tests sicherzustellen, damit man davon ausgehen kann, dass positive Antikörper gemessen werden.

Jedem ausgestanzten Loch wurde dann eine Serumprobe eines Pferdes oder eben eine Kontrollprobe zugeordnet. Nun wurden je 10 µl davon in das jeweilige Stanzloch pipettiert. Die Platten wurden dann in einer mit nassen Tüchern befeuchteten Wanne bei 34°C (+/-1°C) inkubiert. Meist waren die Platten nach 20 bis 24 Stunden bereit, um sie abzulesen. Als Kontrolle, ob die Platten tatsächlich fertig und bereit zum Auswerten sind, wurde die EDQM-Referenz als Vergleich herangezogen. Hatte diese einen Durchmesser von 15,57- 16,39 mm +/- 5%, waren die Platten bereit, um die Ergebnisse abzulesen.

**Tag 3:**

Die Auswertung der Platten begann, wenn die EDQM-Referenz (SouthAfrica03) bzw. die IPC-Referenz (Meath07) die korrekte Zone erreicht hatten. Die Ergebnisse wurden nun durch Ablesen der hämolytischen Zone mit einem digitalen Messschieber ermittelt. Es wurde für jede Serumprobe, also jedes Stanzloch, der Durchmesser im Abstand von 180° abgelesen und in mm angegeben. Für die negativen Kontrollen wurde der Durchmesser einmalig abgelesen und sollte über <3 mm sein.

Es wurde daraufhin die Zone der Hämolyse in mm<sup>2</sup> mit Hilfe der Formel:

$$\pi R^2 = 3,14 \times \frac{\text{Durchmesser 1}}{2} \times \frac{\text{Durchmesser 2}}{2}$$

oder

$$R = \text{Durchmesser 1} \times \text{Durchmesser 2} \times 0,785$$

berechnet und als Richtwert für die vorhandenen Antikörper angesehen.

Die Serumproben der Tage 0, 7, 14 und 21 wurden jeweils zur Überprüfung von zwei verschiedenen Personen gelesen und der Durchschnitt der beiden Ergebnisse als Endergebnis angesehen. Die restlichen Proben wurden jeweils nur von einer Person ausgewertet. Der Autor dieser Arbeit hat die serologische Auswertung der Blutproben der Tage 0, 7, 14 und 21 selbst im Labor durchgeführt. Alle Ergebnisse wurden genau dokumentiert und in eine Tabelle eingetragen, um sie anschließend statistisch auszuwerten.

Alle Gebrauchsmaterialien zur Durchführung des SRH-Tests sind im Anhang aufgelistet.

#### 3.2.4. Statistik

Die ermittelten Ergebnisse wurden manuell in eine Excel-Datei übertragen (Microsoft Office Enterprise, Seattle, USA). Die weiterführende Statistik wurde anschließend mit SPSS erstellt (International Business Machines Corporation IBM, Armonk, USA). Für die statistischen Berechnungen wurde der Mittelwert der SRH-Werte von den Antikörpern gegen Meath07 und South Africa03 genutzt, also die Antikörper gegen H3N8 in ihrer Gesamtheit betrachtet.

Die für die parametrischen Verfahren notwendige Voraussetzung der Normalverteilung wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test überprüft.

Unterschiede der einzelnen Impfstoffgruppen in Bezug auf eine bestimmte Variable wie z.B. Alter oder Geschlecht wurden mittels der einfachen Varianzanalyse ohne Messwiederholung (einfaktorielle ANOVA) getestet. Zur Überprüfung der einzelnen Gruppen in ihrem gesamten Verlauf von D0 bis D201 wurde mit der Varianzanalyse mit Messwiederholungen gearbeitet. Wurden Abweichungen der Mittelwerte festgestellt, so wurden diese Abweichungen mit dem Post-Hoc-Test genauer berechnet. Unterschiede bezüglich Häufigkeiten wurde mit dem chi-Quadrat-Test verglichen. Um Zusammenhänge festzustellen, kam der Korrelationskoeffizienten nach Pearson zum Einsatz. Das Signifikanzniveau wurde mit  $p= 0,05$  festgelegt, das heißt, die Wahrscheinlichkeit einer rein zufälligen Korrelation liegt bei unter 5%.

## 4. ERGEBNISSE UND STATISTIK

### 4.1. Anzahl der Probanden

Die Studie wurde insgesamt mit 104 Pferden gestartet. 35 Pferde wurden mit Duvaxyn IE-T Plus<sup>®</sup> geimpft, 35 Pferde mit Equip FT<sup>®</sup> und 34 mit Proteq Flu Te<sup>®</sup>. Im Verlauf der Studie konnte nicht von jedem Pferd zu jedem Zeitpunkt Blut abgenommen werden, da Pferde verkauft wurden, am Turnier im Einsatz oder für den Tierarzt nicht erreichbar waren. Von 42 Probanden konnten Blutprobenentnahmen zu allen 10 Messzeitpunkten erfolgen. Davon waren 17 in Gruppe 1 (Duvaxyn IE-T Plus<sup>®</sup>), 14 in Gruppe 2 (Equip FT<sup>®</sup>) und 11 in Gruppe 3 (Proteq Flu Te<sup>®</sup>). Die genaue Auflistung der Probenentnahmen der Gruppen zum jeweiligen Messzeitpunkt ist in Tabelle 5 aufgeführt. Aus einer einzigen Blutprobe (Proteq Flu Te<sup>®</sup>, D0) konnte kein klares Serum gewonnen werden, weshalb die Auswertung nicht durchgeführt werden konnte.

Tabelle 5: Anzahl der entnommenen Blutproben (n) der drei Impfstoffgruppen (Duvaxyn IE-T Plus<sup>®</sup>, Equip FT<sup>®</sup>, ProteqFlu Te<sup>®</sup>) zum jeweiligen Zeitpunkt (D0 bis D201= Tag der Blutentnahme nach der Impfung)

Impfstoffgruppe	D0	D7	D14	D21	D55	D90	D121	D150	D180	D201
Duvaxyn IE T Plus <sup>®</sup>	35	34	32	35	29	30	30	23	23	20
Equip FT <sup>®</sup>	35	33	34	33	26	26	26	20	20	15
Proteq Flu Te <sup>®</sup>	34	34	31	30	23	23	23	18	18	14
Insgesamt	104	101	97	98	78	79	79	61	61	49

### 4.2. Alter der Pferde

Das Alter der Pferde lag zwischen 2 und 7 Jahren (Mittelwert:  $3,2 \pm 1,1$  Jahre). In der Duvaxyn IE T Plus<sup>®</sup>-Gruppe betrug das durchschnittliche Alter  $3,2 \pm 0,9$  Jahre, in der Equip FT<sup>®</sup>-Gruppe durchschnittlich  $3 \pm 1,1$  Jahre und in der Proteq Flu Te<sup>®</sup>-Gruppe  $3,3 \pm 1,3$  Jahre. Das Alter der Pferde unterschied sich unter den Impfstoffgruppen nicht

signifikant ( $p= 0,5$ ). Die Altersverteilung der Impfstoffgruppen ist in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Altersverteilung der Pferde in den Impfstoffgruppen (n=104)

Impfstoffgruppe	Alter in Jahren (MW $\pm$ SD)	Minimum in Jahren	Maximum in Jahren
Duvaxyn IE T Plus <sup>®</sup>	3,2 $\pm$ 0,9	2	4
Equip FT <sup>®</sup>	3,0 $\pm$ 1,2	2	7
Proteq Flu Te <sup>®</sup>	3,4 $\pm$ 1,3	2	7

#### 4.3. Geschlechterverteilung

Die Verteilung der Geschlechter der Probanden fiel einheitlich aus (siehe Tabelle 7). Es wurden keine signifikanten Unterschiede der Geschlechtsverteilung zwischen den 3 Gruppen festgestellt ( $p= 0,06$  zwischen Duvaxyn IE T Plus<sup>®</sup> und Equip FT<sup>®</sup>;  $p= 0,38$  zwischen Duvaxyn IE T Plus<sup>®</sup> und Proteq Flu TE<sup>®</sup>;  $p= 0,53$  zwischen Equip FT<sup>®</sup> und Proteq Flu TE<sup>®</sup>) (Tabelle 7).

Tabelle 7: Geschlechterverteilung der einzelnen Impfstoffgruppen an D0 (n=104)

Impfstoffgruppe	Stuten	Hengste	Wallache
Duvaxyn IE T Plus <sup>®</sup>	25	2	8
Equip FT <sup>®</sup>	18	10	7
Proteq Flu Te <sup>®</sup>	13	10	11

#### 4.4. Impfstatus der Probanden zu Beginn der Studie

Vor Beginn der Probenahme hatten die Probanden aller Impfstoffgruppen zwischen 12 und 8 (Mittelwert:  $9 \pm 1$ ) Impfstoffdosen, inklusive Grundimmunisierung, vor der Injektion des Impfstoffes im Zuge der Studie erhalten. Die Anzahl der bereits erhaltenen Impfstoffdosen unterschied sich unter den Impfstoffgruppen nicht voneinander ( $p=0,5$  zwischen Duvaxyn IE T Plus<sup>®</sup> und Proteq Flu TE<sup>®</sup> und zwischen Duvaxyn IE T Plus<sup>®</sup> und Equip FT<sup>®</sup>;  $p=0,16$  zwischen Equip FT<sup>®</sup> und Proteq Flu TE<sup>®</sup>). Die durchschnittliche Anzahl der vor der Studie erhaltenen Impfdosen der Probanden ist in Tabelle 8 ersichtlich.

Das letzte Impfintervall der Probanden (verstrichene Zeit zwischen der vorhergehenden Influenza-Impfung und D0 der Studie) betrug zwischen 139 und 194 Tagen (Mittelwert:  $172 \pm 11,3$  Tage = ca. 5,7 Monate) und unterschied sich unter den Impfstoffgruppen nicht ( $p=0,28$ ).

Tabelle 8: Anzahl der bereits vor der Studie erhaltenen Impfstoffdosen der Probanden der jeweiligen Impfstoffgruppen (n=104)

Gruppe	Anzahl der Impfdosen (MW $\pm$ SD)
Duvaxyn IE T Plus <sup>®</sup>	8 $\pm$ 1,9
Equip FT <sup>®</sup>	7 $\pm$ 1,9
Proteq Flu Te <sup>®</sup>	8 $\pm$ 2,6

#### 4.5. Verlauf der Inneren Körpertemperatur in Folge der Impfung

Die unter Kapitel 3.2.2. durchgeführte klinische Untersuchung schloss eine Messung der IKT der Probanden vor der Impfung (D0, IKT1) und an beiden Folgetagen (D1 und D2, IKT2 und IKT3) ein. Die durchschnittliche IKT der Gesamtheit der Pferde (gruppenunabhängig) betrug an D0  $37,5 \pm 0,4$  °C, an D1  $37,8 \pm 0,4$  °C und an D2  $37,9 \pm 0,4$  °C. Eine leichte Erhöhung im Verlauf der IKT wurde in jeder Gruppe festgestellt (Abbildung 2). Die Maximalwerte der IKT sind in jeder Gruppe auf über  $38,3$ °C angestiegen. Diese entsprechen nicht mehr dem physiologischen Bereich von Pferden. Die Einzelwerte der IKT an den drei Tagen im Gruppenvergleich sind in Tabelle 9 ersichtlich.

Es zeigte sich, dass die Pferde der Duvaxyn IE T Plus<sup>®</sup>-Gruppe an D0 eine signifikant niedrigere IKT hatten als die Pferde der beiden anderen Gruppen ( $p=0,05$  zwischen Duvaxyn IE T Plus<sup>®</sup> und Equip FT<sup>®</sup>;  $p= 0,01$  zwischen Duvaxyn IE T Plus<sup>®</sup> und Proteq Flu Te<sup>®</sup>;  $p= 0,51$  zwischen Equip FT<sup>®</sup> und Proteq Flu Te<sup>®</sup>). Die Messungen an Tag 2 und 3 (D2 und D3) zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ( $p= 0,24$  für D2 und  $p= 0,38$  für D3).

Die Temperaturverläufe der Pferde in den einzelnen Impfstoffgruppen sind in Abbildung 2 dargestellt.

Tabelle 9: Verlauf der IKT in °C an allen 3 Tagen im Gruppenvergleich

Gruppe	Tag	MW $\pm$ SD in °C	Minimum in °C	Maximum in °C
Duvaxyn IE T Plus <sup>®</sup>	D0 (n=104)	37,3 $\pm$ 0,4	36,3	38,2
	D1 (n=104)	37,7 $\pm$ 0,4	37,1	38,7
	D2 (n=104)	37,9 $\pm$ 0,3	37,2	38,6
Equip FT <sup>®</sup>	D0 (n=104)	37,5 $\pm$ 0,5	36,3	38,2
	D1 (n=104)	37,8 $\pm$ 0,5	37,1	38,7
	D2 (n=104)	37,8 $\pm$ 0,4	37,2	38,5
Proteq Flu <sup>®</sup>	D0 (n=104)	37,7 $\pm$ 0,3	36,9	38,0
	D1 (n=104)	37,9 $\pm$ 0,4	37,2	38,8
	D2 (n=104)	37,9 $\pm$ 0,4	37,3	38,7

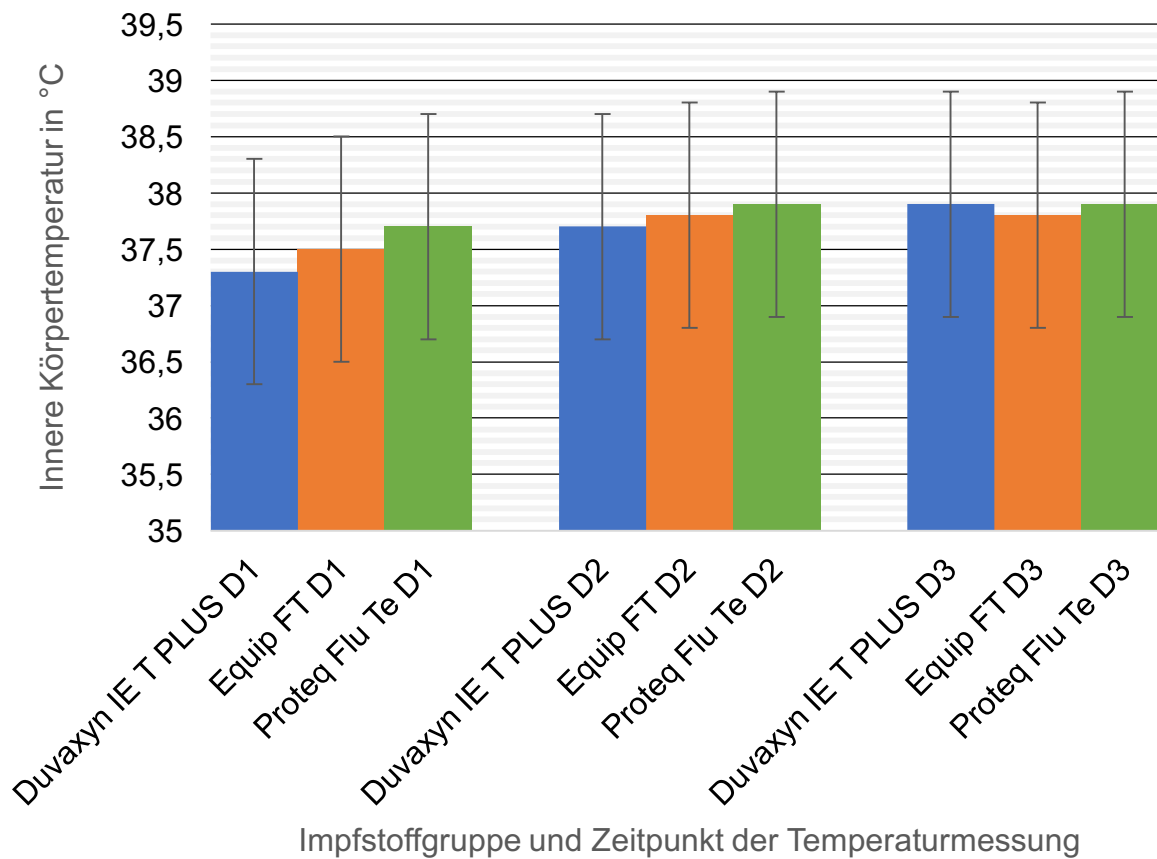


Abbildung 2: Verlauf der IKT in °C an den 3 Tagen der Messung (D1, D2, D3) der 3 Gruppen (Duvaxyn IE T Plus<sup>®</sup>, Equip FT<sup>®</sup> und ProteqFlu Te<sup>®</sup>) im Vergleich (n= 104)

#### 4.6. Systemische und lokale Nebenwirkungen in Folge der Impfung

Ein Pferd der ProteqFlu Te<sup>®</sup>-Gruppe zeigte an den Folgetagen nach der Impfung (D2 und D3) eine IKT von über 39,5°C und Koliksymptome. Dieses Pferd wurde aus der Studie ausgeschlossen, da nicht davon ausgegangen wurde, dass die Impfung die Symptomatik auslöste und es außerdem einer sofortigen Behandlung bedurfte.

Insgesamt wurde bei 20 der 104 Pferden eine lokale Reaktion an der Injektionsstelle beobachtet. 9 (26,5%) davon aus der Proteq Flu Te<sup>®</sup>-Gruppe, 8 (22,9%) davon aus der Equip FT<sup>®</sup>-Gruppe und 3 (8,6%) davon aus der Duvaxyn IE T Plus<sup>®</sup>-Gruppe. Diese Ergebnisse ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den Impfstoffgruppen ( $p= 0,14$ ). Alle Umfangsvermehrungen verschwanden innerhalb der ersten Woche nach der Impfung.

#### 4.7. Immunantwort

##### 4.7.1. Antikörpertiter der Pferde am Tag der Impfung D0

Am ersten Tag der Studie (D0) lag der durchschnittliche SRH-Wert der Pferde zwischen 52,3 mm<sup>2</sup> und 180 mm<sup>2</sup> (Mittelwert: 111 ± 27,0 mm<sup>2</sup>). Dieser Ausgangs-SRH-Wert unterschied sich zwischen den einzelnen Impfstoffgruppen nicht voneinander (p=0,21 zwischen Duvaxyn IE T Plus<sup>®</sup> und Equip FT<sup>®</sup>; p= 1,00 zwischen Duvaxyn IE T Plus<sup>®</sup> und Proteq Flu Te<sup>®</sup>; p= 0,12 zwischen Equip FT<sup>®</sup> und Proteq Flu Te<sup>®</sup>) (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: SRH-Werte in mm<sup>2</sup> der Pferde in den drei Impfstoffgruppen vor der Impfung an D0 der Studie (n=104)

Impfstoffgruppe	SRH-Wert D0 MW ± SD in mm <sup>2</sup>	Minimum in mm <sup>2</sup>	Maximum in mm <sup>2</sup>
Duvaxyn IE T Plus <sup>®</sup>	114 ± 32,5	59,4	180
Equip FT <sup>®</sup>	103 ± 23,1	52,3	160
Proteq Flu Te <sup>®</sup>	116 ± 23,0	68,8	157

Beeinflusst wird der Ausgangs-SRH-Wert (D0) von der Anzahl der vorangegangenen Influenza-Impfungen und vom Alter der Pferde. Die Anzahl der vorangegangenen Impfdosen und somit auch das Alter (je älter, desto mehr Impfdosen) der Probanden korreliert positiv mit der Höhe der Antikörpertiter an D0 (p= 0,00). Die Anzahlen der vorangegangenen Impfdosen können Tabelle 8 und die Altersverteilung Tabelle 6 entnommen werden.

Das Alter der Pferde am Tag der Impfung lag zwischen 7 und 12 Monaten (Mittelwert: 9 ± 1 Monate) und korrelierte nicht mit der Höhe der Antikörpertiter an D0 der Studie (p= 0,77).

#### 4.7.2. Antikörpertiterbildung gegen *A/equine/SouthAfrica/4/2003* und *A/equine/Richmond/1/07*

Wie im Kapitel 3.2.3. beschrieben, wurden die Pferde aller Impfstoffgruppen auf die Antikörperbildung gegen die Antigene *A/equine/SouthAfrica/4/2003* und *A/equine/Richmond/1/07* untersucht. Aufgrund der sehr ähnlichen SRH-Wert-Verläufe der beiden Antigene wurden alle weiteren Berechnungen mit dem Mittelwert dieser beiden durchgeführt. Die folgenden Abbildungen 3, 4 und 5 sollen die Ähnlichkeiten im Verlauf der Antikörperbildung der beiden Antigene besser darstellen.

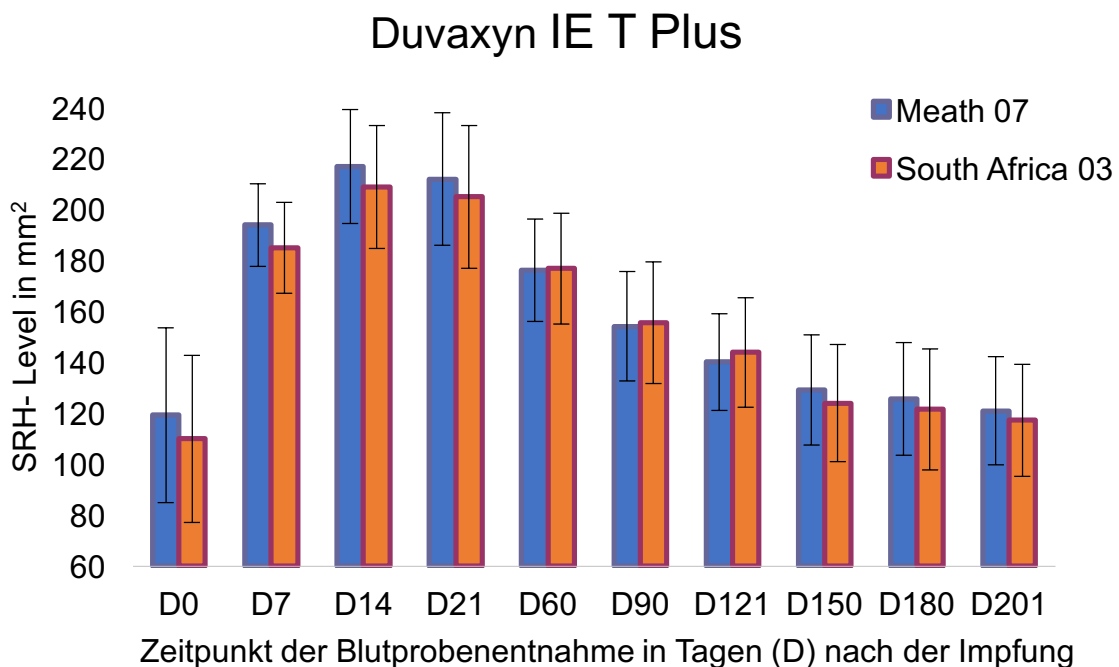


Abbildung 3: Verlauf der antigenspezifischen SRH-Werte in mm<sup>2</sup> der Pferde, die mit Duvaxyn IE T Plus<sup>®</sup> geimpft wurden

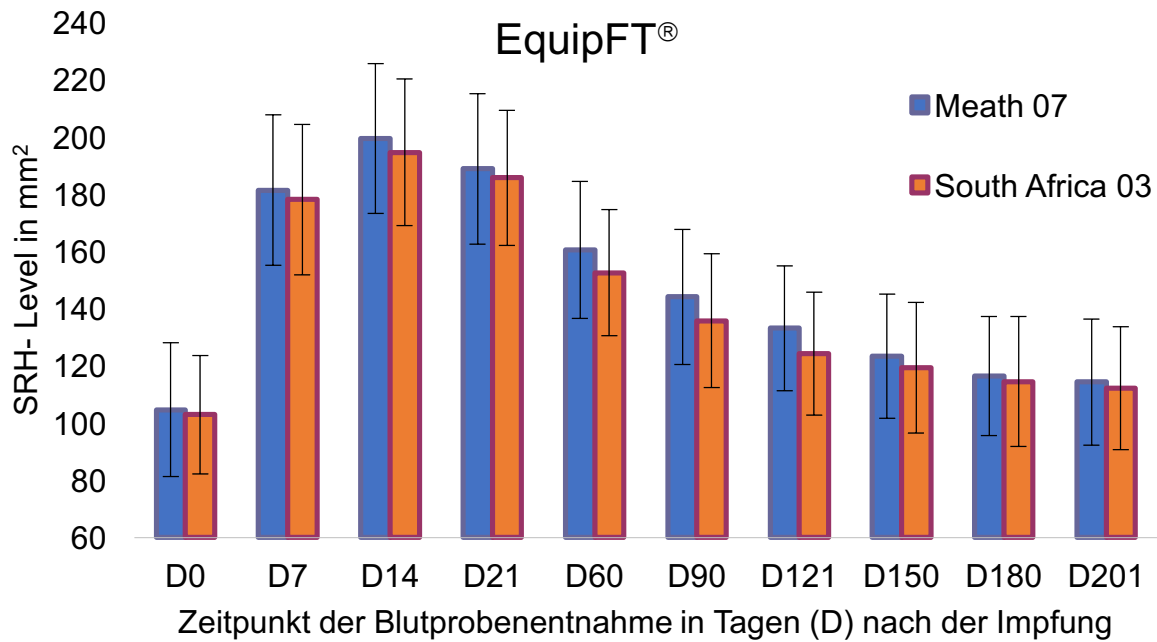


Abbildung 4: Verlauf der antigenspezifischen SRH-Werte in mm<sup>2</sup> der Pferde, die mit Equip FT® geimpft wurden

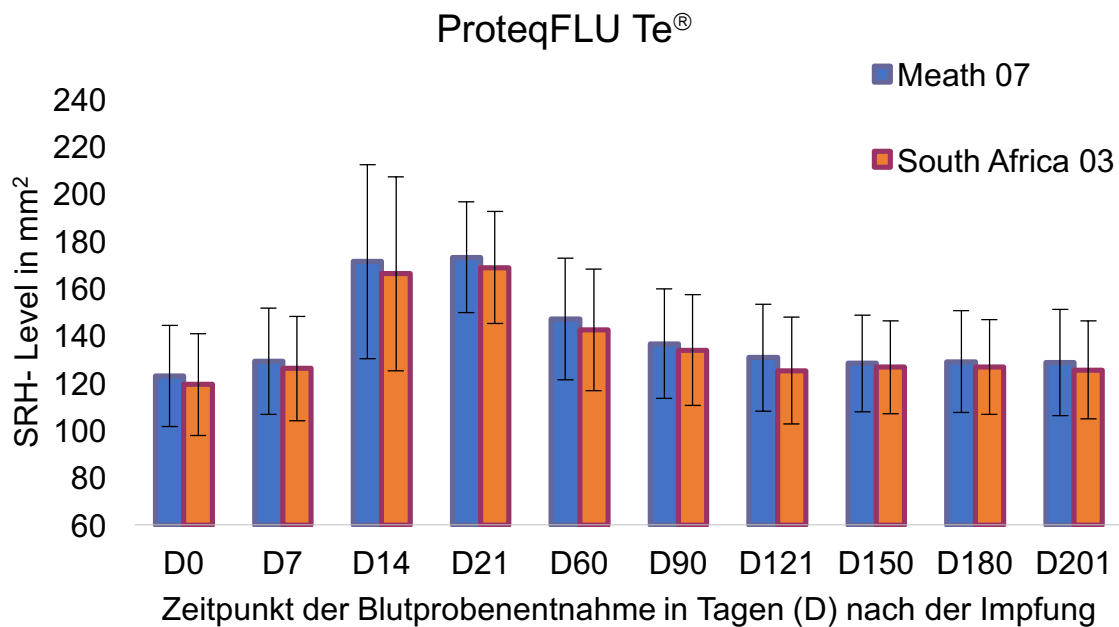


Abbildung 5: Verlauf der antigenspezifischen SRH-Werte in mm<sup>2</sup> der Pferde, die mit ProteqFlu Te® geimpft wurden

#### 4.7.3. Verlauf der Antikörpertiter der Pferde in den drei Impfstoffgruppen

Im Gruppenvergleich zeigten sich die Immunantwort der Pferde der Duvaxyn IE T Plus<sup>®</sup>-Gruppe und die der Equip FT<sup>®</sup>-Gruppe sehr ähnlich in ihrem Verlauf. Die Titer der Pferde dieser beiden Gruppen stiegen von D0 bis D7 deutlicher und schneller an und erreichten ihren Maximalwert an D14. Von diesem Zeitpunkt an zeigten beide Gruppen einen stetigen Abfall der SRH-Levels. An D201 erreichten diese SRH-Werte wieder annähernd ihre Ausgangswerte von D0. Der Antikörpertiterverlauf der ProteqFlu Te<sup>®</sup>-Gruppe hob sich durch einen zwischen D7 und D14 langsameren Anstieg hervor. Maximalwerte wurden erst an D21 erreicht. Auch der SRH-Wert der Pferde dieser Gruppe sank nach diesem Zeitpunkt stetig, jedoch weniger stark zwischen D150 und 201 als die anderen beiden Gruppen (Duvaxyn IE T Plus<sup>®</sup> und Equip FT<sup>®</sup>) (siehe Abbildung 6).

Ebenso zeigte sich, dass die Titer der Pferde aus der ProteqFlu Te<sup>®</sup>-Gruppe zu keinem Messzeitpunkt so hoch werden wie die der beiden anderen Gruppen (p-Werte unter Punkt 4.7.3.3.). Pferde der Gruppe 1 (Duvaxyn IE T Plus<sup>®</sup>) bilden die höchsten Antikörpertiter (siehe Abbildung 3, p-Werte unter Punkt 4.7.3.1.), gefolgt von den Pferden der Gruppe 2 (Equip FT<sup>®</sup>) (p-Werte unter Punkt 4.7.3.2.; siehe Abbildung 4) und schließlich Pferden der Gruppe 3 (Proteq Flu<sup>®</sup>) (siehe Abbildung 5). Die durchschnittlichen SRH-Levels jeder Gruppe zu jedem Messzeitpunkt können Tabelle 20 im Anhang entnommen werden.

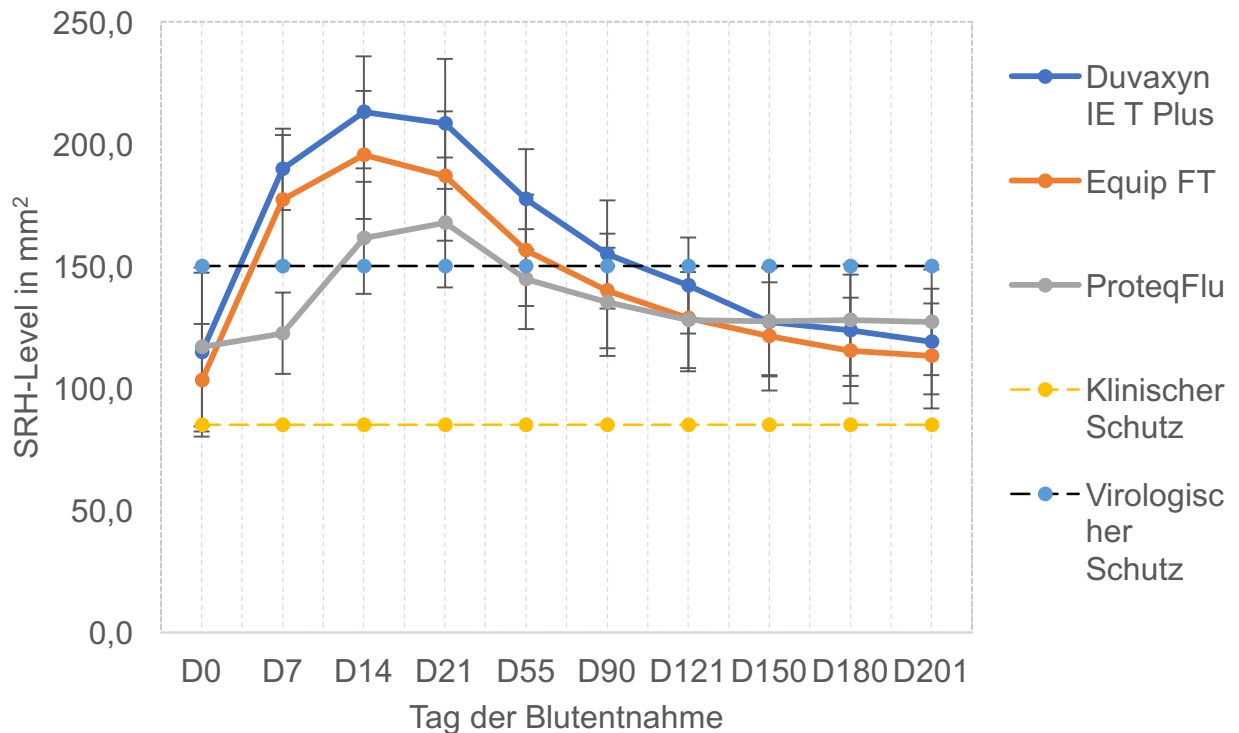


Abbildung 6: Verlauf der Antikörpertiter in  $\text{mm}^2$  aller drei Gruppen (gelbe Linie:  $85 \text{ mm}^2$ , schwarze Linie:  $150 \text{ mm}^2$ : Schützender Titer bei Infektionsversuchen)

#### 4.7.3.1. Vergleich des SRH-Verlaufes zwischen Duvaxyn IE T Plus<sup>®</sup> und Equip FT<sup>®</sup>

Die Pferde der Duvaxyn IE T Plus<sup>®</sup>-Gruppe wiesen statistisch signifikant höhere SRH-Werte im Vergleich zu den Pferden der Equip FT<sup>®</sup>-Gruppe an D14 ( $p=0,04$ ), an D21 ( $p=0,00$ ) und D55 ( $p=0,05$ ) auf. An D90 und an D121 wiesen die Pferde Duvaxyn IE T Plus<sup>®</sup>-Gruppe höhere SRH-Levels als die Equip FT<sup>®</sup>-Gruppe auf, welche jedoch knapp nicht signifikant ausfielen ( $p=0,06$ ).

#### 4.7.3.2. Vergleich des SRH-Verlaufes zwischen Duvaxyn IE T Plus<sup>®</sup> und Proteq Flu Te<sup>®</sup>

Die SRH-Levels der Pferde der Duvaxyn IE T Plus<sup>®</sup>-Gruppe wiesen von D7 bis D55 stets signifikant höhere SRH-Levels im Vergleich zu den Pferden der Proteq Flu Te<sup>®</sup>-Gruppe auf (jeweils  $p=0,00$  bzw. an D90  $p=0,01$ ).

#### 4.7.3.3. Vergleich des SRH-Verlaufes zwischen Equip FT<sup>®</sup> und Proteq Flu Te<sup>®</sup>:

Die Pferde der Equip FT<sup>®</sup>-Gruppe wiesen statistisch signifikant höhere SRH-Levels als die Pferde der Proteq Flu Te<sup>®</sup>-Gruppe an D7 und D14 ( $p= 0,00$ ) und an D21 ( $p= 0,01$ ) auf.

Die einzelnen Verläufe der SRH-Levels aller Gruppen können in Abbildung 6 eingesehen und verglichen werden.

#### 4.7.4. Anstieg der Antikörpertiter von D0 bis D21

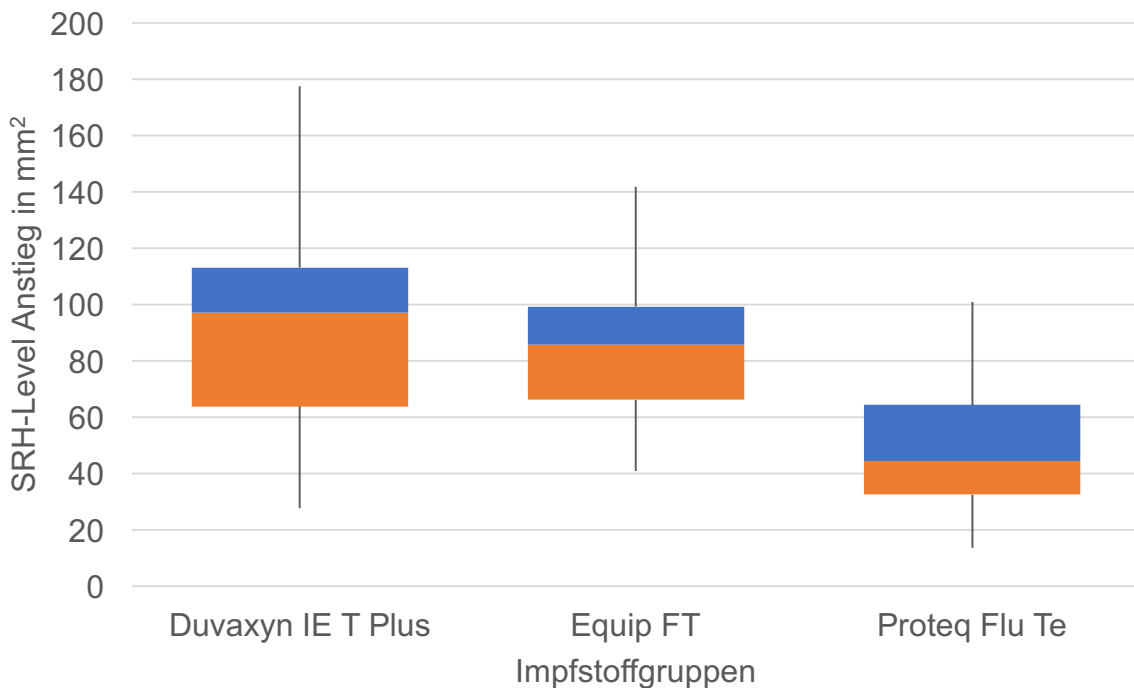
Die Steigung der SRH-Levels (Differenz der SRH-Levels zwischen 2 Messzeitpunkten) ist ein Maß für die Reaktion des Immunsystems der Pferde auf die jeweiligen Impfstoffe.

Die Pferde der Duvaxyn IE T Plus<sup>®</sup>-Gruppe wiesen einen Antikörperanstieg von 27,7 bis 177 mm<sup>2</sup> (Mittelwert:  $93,4 \pm 38,4$  mm<sup>2</sup>) zwischen D0 und D21 auf. Die Pferde der Equip FT<sup>®</sup>-Gruppe wiesen einen Antikörpertiteranstieg zwischen 40,8 und 142 mm<sup>2</sup> (Mittelwert:  $83,6 \pm 24,9$  mm<sup>2</sup>) auf. Die Pferde der Proteq Flu Te<sup>®</sup>-Gruppe wiesen einen Antikörpertiteranstieg zwischen 13,8 und 101 mm<sup>2</sup> (Mittelwert:  $48,9 \pm 22,8$  mm<sup>2</sup>). Es zeigte sich kein statistischer Unterschied zwischen der Duvaxyn IE T Plus<sup>®</sup>-Gruppe und der Equip FT<sup>®</sup>-Gruppe ( $p= 0,54$ ) (Abbildung 7, Tabelle 11). Die Pferde der Proteq Flu Te<sup>®</sup>-Gruppe wiesen einen signifikant niedrigeren Antikörpertiteranstieg im Vergleich zu den Pferden der anderen beiden Gruppen (Duvaxyn IE T Plus<sup>®</sup> und Equip FT<sup>®</sup>) bis zum Zeitpunkt D21 auf (Abbildung 7, Tabelle 11).

Drei Probanden reagierten auf die Impfung mit einem nicht ausreichenden Antikörpertiteranstieg von unter 25 mm<sup>2</sup> innerhalb der ersten 21 Tage. Diese sogenannten „Poor responders“ befanden sich ausschließlich in der Proteq Flu Te<sup>®</sup>-Gruppe.

Tabelle 11: Anstieg des SRH-Wertes in mm<sup>2</sup> von D0 bis D21 in den Impfstoffgruppen

Impfstoffgruppe, (n)	SRH-Wert-Anstieg in mm <sup>2</sup> von D0 bis D21; Mittelwert $\pm$ SD	Minimum in mm <sup>2</sup>	Maximum in mm <sup>2</sup>
Duvaxyn IE T Plus <sup>®</sup> (n=35)	93,4 $\pm$ 38,4	27,7	177,5
Equip FT <sup>®</sup> (n=33)	83,6 $\pm$ 24,9	40,8	141,9
Proteq Flu Te <sup>®</sup> (n=30)	48,9 $\pm$ 22,8	13,8	100,9

Abbildung 7: SRH-Level Anstieg in mm<sup>2</sup> zwischen D0 und D21 im Gruppenvergleich mit Minimal- und Maximalwerten sowie Mittelwerten und Standardabweichung

#### 4.7.5. Korrelationen in Bezug auf den Anstieg der Antikörpertiter von D0 bis D21

Der Anstieg der Antikörpertiter von D0 bis D21 wird beeinflusst von dem Alter der Pferde (positive Korrelation,  $p= 0,00$ ), der Anzahl der bereits erhaltenen Impfstoffdosen ( $p= 0,01$ ) und dem Antikörpertiter der Pferde am D0 ( $p=0,01$ ). Zusätzlich zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen dem Anstieg der Antikörpertiter von D0 bis D21 und dem Impfintervall zwischen der letzten Impfung vor der Studie ( $p= 0,01$ ) und der Impfung im Zuge der Studie. Je kürzer das Impfintervall zwischen vorausgegangener und aktueller Impfung, desto höher der SRH-Anstieg.

Der Anstieg der Antikörpertiter von D0 bis D21 vom Geschlecht der Pferde ( $p= 0,6$  bei Duvaxyn IE T Plus<sup>®</sup>;  $p= 0,27$  bei Equip FT<sup>®</sup>;  $p= 0,90$  bei Proteq Flu Te<sup>®</sup>) (Tabelle 12).

Tabelle 12: Geschlechterverteilung und Anstieg im SRH-Titer-Mittelwert in  $\text{mm}^2$  von D0-D21 in den einzelnen Impfstoff-Gruppen

Gruppe	Geschlecht	Anzahl n	Mittelwert in $\text{mm}^2 \pm$ Standardabweichung
Duvaxyn IE T Plus <sup>®</sup>	Wallach	8	84,4 $\pm$ 25,9
	Stute	25	97,6 $\pm$ 41,7
	Hengst	2	77,5 $\pm$ 46,8
Equip FT <sup>®</sup>	Wallach	6	92,5 $\pm$ 16,2
	Stute	17	86,6 $\pm$ 28,5
	Hengst	10	73,3 $\pm$ 20,7
Proteq Flu Te <sup>®</sup>	Wallach	10	47,2 $\pm$ 23,9
	Stute	11	51,6 $\pm$ 26,3
	Hengst	9	47,6 $\pm$ 19,2

#### 4.7.6. Anstieg der Antikörpertiter von D0 bis D7, D7 bis D14, D14 bis D21

Die Pferde der ProteqFlu Te<sup>®</sup>-Gruppe wiesen zwischen allen Messzeitpunkten ( $p= 0,00$ ) signifikant geringere Anstiege der Antikörpertiter im Vergleich zu den Anstiegen in den Pferden der anderen Gruppen (Duvaxyn IE T Plus<sup>®</sup> und Equip FT<sup>®</sup>) auf. Die Anstiege der Antikörpertiter der Pferde der Duvaxyn IE T Plus<sup>®</sup>-Gruppe unterschieden

sich nicht signifikant von denen der Equip FT<sup>®</sup>-Gruppe ( $p= 1,00$  für D0-D7 und D7-D14;  $p=0,9$  für D14-D21). Die Anstiege der Antikörpertiter sind Tabelle 13 zu entnehmen.

Tabelle 13: SRH-Wert-Anstiege in  $\text{mm}^2$  der Pferde von D0 bis D7, D7 bis D14 und D14 bis D21 der jeweiligen Impfstoffgruppen

Impfstoffgruppe	SRH-Wert-Anstieg bzw. -Abfall in $\text{mm}^2$ von D0 bis D7; Mittelwert $\pm$ SD; (n)	SRH-Wert-Anstieg bzw. -Abfall in $\text{mm}^2$ von D7 bis D14; Mittelwert $\pm$ SD; (n)	SRH-Wert-Anstieg bzw. -Abfall in $\text{mm}^2$ von D14 bis D21; Mittelwert $\pm$ SD; (n)
Duvaxyn IE T Plus <sup>®</sup>	70,6 $\pm$ 34,7 (n= 34)	21,6 $\pm$ 15,9 (n= 32)	-4,7 $\pm$ 16,3 (n= 32)
Equip FT <sup>®</sup>	69,0 $\pm$ 30, 5 (n= 33)	16,5 $\pm$ 12,3 (n= 33)	-8,1 $\pm$ 12,7 (n= 33)
Proteq Flu Te <sup>®</sup>	4,3 $\pm$ 7,6 (n= 34)	26,6 $\pm$ 20,5 (n= 31)	19,2 $\pm$ 47,5 (n= 28)

#### 4.7.7. Verlauf der Antikörpertiter von D21 bis D201

Der weitere Verlauf der Antikörpertiter von D21 bis zum D201 zeigte einen Abfall, welcher sich nicht zwischen den Impfstoffgruppen unterschied ( $p= 0,12$ ). Aber zwischen D90 und D201 zeigte der SRH-Wert der Duvaxyn IE T Plus<sup>®</sup>-Gruppe einen signifikant stärkeren Abfall als jener der ProteqFlu Te<sup>®</sup>-Gruppe ( $p= 0,00$ ) (Tabelle 14).

Tabelle 14: Abfall der SRH-Werte in  $\text{mm}^2$  der Pferde von D21 bis D201 der jeweiligen Impfstoffgruppe

Impfstoffgruppe, (n)	SRH-Wert-Abfall in $\text{mm}^2$ von D21 bis D90; Mittelwert $\pm$ SD; (n)	SRH-Wert-Abfall in $\text{mm}^2$ von D90 bis D201; Mittelwert $\pm$ SD; (n)
Duvaxyn IE T Plus <sup>®</sup> (n=16)	-42,4 $\pm$ 33,1	-36,6 $\pm$ 20,7
Equip FT <sup>®</sup> (n=14)	-49,6 $\pm$ 15,1	-25,3 $\pm$ 18,1
Proteq Flu Te <sup>®</sup> (n=12)	-33,8 $\pm$ 28,3	-12,6 $\pm$ 16,6

#### 4.7.8. Schützender Titer der Antikörper

Sowohl an D0, als auch an allen anderen Tagen wiesen einige Pferde weder einen klinischen, noch einen virologischen Schutz vor Influenza auf. Nur an zwei Zeitpunkten (D14 und D21) zeigten alle Pferde einen SRH-Wert, der sie vor einer klinischen Influenza im Falle einer Infektion schützen sollte. Zu keinem Zeitpunkt wiesen alle Pferde einen virologischen Schutz vor Influenza auf. In der folgenden

Tabelle 15 sind die Anzahlen der klinisch bzw. virologisch geschützten Pferde der Impfstoffgruppen zum jeweiligen Messzeitpunkt aufgelistet. In Abbildung 6 sind die schützenden Antikörpertiter-Level (SRH-Werte) des klinischen Schutzes ( $85 \text{ mm}^2$ ) und des virologischen Schutzes ( $150 \text{ mm}^2$ ) im Vergleich zum durchschnittlichen Antikörpertiterverlauf der einzelnen Gruppen zu sehen.

Tabelle 15: Gruppenspezifische Anzahl der Pferde eingeordnet in Kategorie der klinisch bzw. virologisch Ungeschützten zu jedem Zeitpunkt

Zeitpunkt	Anzahl der Pferde mit einem SRH-Werte unter $<85 \text{ mm}^2$ Klinisch nicht geschützt			Anzahl der Pferde mit einem SRH-Werte unter $<150 \text{ mm}^2$ Virologisch nicht geschützt		
	Duvaxyn IE T Plus <sup>®</sup>	Equip FT <sup>®</sup>	Proteq Flu Te <sup>®</sup>	Duvaxyn IE T Plus <sup>®</sup>	Equip FT <sup>®</sup>	Proteq Flu Te <sup>®</sup>
D0 (n= 104)	8	5	3	29	33	31
D7 (n= 101)	0	0	2	1	5	30
D14 (n= 97)	0	0	0	0	1	12
D21 (n= 98)	0	0	0	1	1	8
D55 (n=78)	0	0	1	2	10	12
D90 (n=79)	0	0	1	15	19	16
D121 (n=79)	0	0	1	16	19	19
D150 (n=61)	1	1	1	20	17	15
D180 (n=61)	1	1	1	22	19	16
D201 (n=49)	2	0	1	20	14	12

## 5. DISKUSSION

### 5.1 Anzahl der Probanden

Die Studie umfasste zu Beginn 104 Pferde. Auch wenn die Anzahl der Pferde im Verlauf der Studie gesunken ist, und am letzten Tag der Studie nur 49 Pferde beprobt werden konnten, ist die Anzahl der entnommenen Blutproben dennoch höher als in den meisten anderen Studien dieser Art. Ähnliche Studien wurden in Irland mit 44 Pferden und 66 Pferden durchgeführt, was die vorliegende Studie sehr aussagekräftig macht (GILDEA et al., 2011a,b).

### 5.2. Die innere Körpertemperatur der Pferde in Folge der Impfung

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal der Verlauf der inneren Körpertemperatur der Pferde an den Folgetagen nach einer Influenza-Impfung im Vergleich dreier Impfstoffe gemessen, deswegen gibt es hierfür keine Vergleichswerte. Die innere Körpertemperatur der Pferde wurde am Tag der Impfung und an den beiden Folgetagen gemessen. Hierbei gilt die These zu prüfen, ob und für wie lange Pferde nach einer Influenza-Impfung geschont werden sollen. Dafür wäre es notwendig gewesen die innere Körpertemperatur aber über einen längeren Zeitraum beobachten bzw. klinisch untersuchen müssen, bis jedes Pferd ausschließlich physiologische Befunde aufgewiesen hätte. Im Verlauf der IKT an den drei Tagen der Messung waren aber keine signifikanten Anstiege nach der Impfung zu sehen (siehe Abb. 2). Die Pferde hatten zwar eine höhere IKT am Tag nach der Impfung und eine noch höhere am Folgetag, diese Steigungen waren aber gering und nicht signifikant. Nachdem die Messungen am Tag 2 nach der Impfung eingestellt wurden, gibt es auch keine Auskunft über den weiteren Verlauf und deshalb keine Erkenntnis, wie lange ein Pferd nach einer Impfung nicht gearbeitet bzw. transportiert werden soll. Zudem hängt die IKT auch von vielen anderen Faktoren ab, die nicht in diese Studie miteinbezogen wurden.

### 5.3. Lokale Reaktionen an der Injektionsstelle in Folge der Impfung

Lokale Reaktionen nach der Vakzinierung an der Injektionsstelle wurden ebenfalls an den beiden Folgetagen bewertet. Insgesamt wurden bei allen 104 Pferden lediglich 20 lokale Umfangsvermehrungen an der Injektionsstelle dokumentiert.

Umfangsvermehrungen sind eine nicht ungewöhnliche Reaktion nach Impfungen, die auch als solche in der Packungsbeilage aller verwendeten Impfstoffe angeführt sind. Alle Umfangsvermehrungen verschwanden innerhalb der ersten sieben Tage nach der Vakzinierung. Auch wenn dieses Ergebnis nicht signifikant ist, traten immerhin neun dieser 20 beschriebenen Umfangsvermehrungen bei Pferden auf, die mit Proteq Flu Te<sup>®</sup> geimpft wurden und acht bei Pferden, die mit Equip FT<sup>®</sup> geimpft wurden. Lediglich drei dieser Veränderungen wurden bei Pferden der Duvaxyn IE T Plus<sup>®</sup>-Gruppe festgestellt. Dieses Ergebnis konnte in anderen Untersuchungen dieser Art nicht wiedergegeben werden, da hier meist keine lokalen Reaktionen vermerkt wurden und auch nicht darauf geachtet wurde, obwohl in der Studie von GILDEA et al., 2011 auch die hier verwendeten Impfstoffe angewendet wurden. Eine geringgradige Umfangsvermehrung (Durchmesser bis 12 cm) sollte demnach als normale Nebenwirkung angesehen werden. Sind die Umfangsvermehrungen jedoch sehr groß oder auf andere Weise auffällig (z.B. sehr schmerzhaft, warm) bzw. zeigt ein Pferd andere Nebenwirkungen, sollte es einem Tierarzt vorgestellt werden und der Impfstoffhersteller über diese Nebenwirkungen informiert werden.

#### 5.4. Antikörpertiter der Pferde an D0 und Schutz

Das durchschnittliche SRH-Level der Pferde war zu Beginn der Studie bei 111 mm<sup>2</sup> +/- 27,0. Dies lag etwas unter dem Durchschnitt verglichen mit den Pferden der irischen Studien, welche Mittelwerte um 123 mm<sup>2</sup> beschrieben (GILDEA et al., 2010; GILDEA et al., 2011a).

Zu Beginn der Studie war kein signifikanter Unterschied im SRH-Level der Pferde zwischen den einzelnen Gruppen gegeben. Deswegen ist davon auszugehen, dass alle Probanden dieselbe Ausgangssituation betreffend der Antikörpertiter aufwiesen (siehe Abb. 3). Die Pferde befanden sich alle zumindest im Bereich des klinischen Schutzes vor einer Infektion (MUMFORD et al., 1992a; MUMFORD et al., 1994a,b; MUMFORD, 2001), wenn man davon ausgeht, dass der infizierende Feldstamm antigenisch dem in der Impfung enthaltenem Stamm entspricht (DALY et al., 2004). SRH-Werte über 85 mm<sup>2</sup> gewährleisten zwar einen klinischen, jedoch keinen virologischen Schutz vor einer Infektion, welcher erst ab Werten über 150 mm<sup>2</sup> eintritt (MUMFORD, 2001). Der virologische Schutz verhindert, dass Pferde das Virus

ausscheiden. Im gesamten Verlauf der Studie gab es keinen Zeitpunkt, an welchem alle 104 Pferde virologisch geschützt waren. Lediglich an zwei Zeitpunkten (2 Wochen bzw. 3 Wochen nach der Booster-Impfung) waren alle Pferde klinisch geschützt d.h. sie hätten bei einer Influenza-Infektion keine bzw. nur eine milde Erkrankung entwickelt. Dies ist keine unbekanntes Erkenntnis, denn auch in vergleichbaren Studien zeigte sich, dass innerhalb von 6 Monaten nach einer Impfung die Antikörpertiter der Pferde teilweise sowohl unter der Grenze des virologischen als auch des klinischen Schutzes lagen (GILDEA et al., 2011a). Die begrenzte Dauer eines Immunschutzes nach einer Impfung gegen das equine Influenzavirus sollte in der Praxis bedacht werden. Die Tiere sind mit einem SRH-Wert von über  $85 \text{ mm}^2$  vor klinischen Symptomen geschützt, bzw. haben nur eine schwächere Form der klinischen Symptomatik. Unter einem SRH-Wert von  $150 \text{ mm}^2$  kann die Infektion und kurzfristige Virusausscheidung dennoch nicht verhindert werden (HANNANT et al., 1988; HANNANT et al., 1989), was eine bedeutende Gefahr für andere Pferde darstellt. Bei der genaueren Betrachtung von Influenza-Ausbrüchen in Irland zeigte sich, dass der Großteil der erkrankten Pferde nicht geimpft war, und bei vielen Pferden mit klinischen Symptomen die letzte Impfung mehr als 6 Monate zurücklag (GILDEA et al., 2011a). Aufgrund der Tatsache, dass ein vollständiger virologischer Schutz nur über kurze Zeiträume erreicht werden kann, und dass die Werte der impfinduzierten Antikörper bei einem Großteil der Pferde bereits sechs Monate nach der Vakzinierung unter denen für einen klinischen Schutz vor Infektion liegen, ist eine Impfung der Pferde mindestens alle 6 Monate dringend zu empfehlen (NELSON et al., 1998; NEWTON et al., 2000a). Dies wird auch in der hier vorliegenden Studie bestätigt.

#### 5.5. Antikörperbildung gegen kursierende Stämme

Der Impferfolg hängt nicht nur von der Quantität, beziehungsweise von den Intervallen der Vakzinierungen ab, sondern auch von der antigenischen Übereinstimmung von infizierendem, aktuell kursierendem Virus und dem im Impfstoff enthaltenen Virus ab. Bei einem Influenzaausbruch in England bestätigte sich dies dadurch, dass viele Vollblüter trotz Impfung erkrankten. Nach entsprechenden Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die geimpften Virusstämme (eurasische und amerikanische Linien des Subtyps H3N8) nicht mit dem die Pferde infizierenden Antigen der

Untergruppe Florida Clade 2 übereinstimmte, mit dem die Pferde infiziert wurden (NEWTON et al., 2006). Die Höhe der Antikörpertiter gegen equine Influenza wurde zwar experimentell als eine mögliche Basis für eine Kreuzimmunität gegen neue Virusstämme oder Subtypen dargestellt (YATES et al., 2000), aber in diesem Fall konnte dies nicht bestätigt werden. Die impfinduzierte Immunität war nicht ausreichend, um die Tiere vor einem anderen Virusstamm zu schützen (NEWTON et al., 2006). Anhand dieses Beispiels soll verdeutlicht werden, wie wichtig die jeweilige Homologie der Influenza-Feldstämme mit den in den erhältlichen Vakzinen gegen equines Influenzavirus enthaltenen Impfstämmen ist. Das Expertengremium der OIE dokumentiert und kontrolliert jährlich die weltweit zirkulierenden Virusisolate und gibt demnach Empfehlungen ab, welche Stämme in den Impfstoffen enthalten sein sollen. Derzeit gilt die Empfehlung, dass Impfstoffe gegen equines Influenzavirus Stämme der Sublinien Florida Clade 1 und Florida Clade 2 beinhalten sollen (OIE, 2017). Es gibt in Deutschland vier zugelassene Influenzaimpfstoffe für Pferde, wovon nur einer dieser Impfstoffe dieses Kriterium erfüllt. In der vorliegenden Studie wurden zwei Impfstoffe, die A/eq/OHIO/03 und A/eq/RICHMOND/1/07 nicht enthalten und ein Impfstoff, der A/eq/OHIO/03 und A/eq/RICHMOND/1/07 enthält, verglichen.

#### 5.6. Allgemeine Erkenntnisse im Zusammenhang mit dem Antikörpertiter

Der Antikörpertiter am D0, also vor der Impfung, war bei jenen Pferden signifikant höher, die bereits eine höhere Anzahl an Impfstoffdosen in der Gesamtheit erhalten hatten. Ebenso war der Anstieg der Konzentration der Antikörpertiter dieser Pferde zwischen Tag 0 und Tag 21 signifikant höher (siehe Abb. 7). Sowohl die Anzahl der erfolgten Impfungen, als auch deren Frequenz haben einen maßgeblichen Einfluss auf die Immunantwort und den daraus resultierenden Impfschutz. Nachdem die Anzahl der erhaltenen Impfstoffdosen signifikant mit dem Alter der Pferde korreliert, haben ältere Pferde, vorausgesetzt sie wurden regelmäßig geimpft, einen besseren Schutz vor Infektionen auf Grund eines bereits besser geprägten Immunsystems. Demnach würden ältere, schon öfter geimpfte Pferde, weniger oft eine Booster-Impfung benötigen. Es gibt allerdings in der Literatur noch keine Untersuchungen, ab welchem Alter oder nach welcher Anzahl von Impfungen eine verminderte Frequenz der Vakzinierung angebracht wäre.

Das Alter der Pferde am Tag ihrer ersten Impfung hat keine Auswirkung auf die entstehende Immunantwort. Nicht der Zeitpunkt der Grundimmunisierung ist ausschlaggebend, sondern vielmehr deren korrekte Durchführung und die der entsprechend wiederholten Auffrischungsimpfungen. Auch diese Beobachtung machten GILDEA et al. bereits im Jahr 2011.

In der vorliegenden Studie wurden Pferde jedes Geschlechts mit einbezogen. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Immunantwort bezüglich des Geschlechtes des Pferdes. In zwei anderen Untersuchungen konnte ebenfalls keine Verbindung zwischen Immunantwort und Geschlecht hergestellt werden (NEWTON et al., 2000a; GILDEA et al., 2011a). Hierzu ist im Widerspruch die Beobachtung, dass männliche Vollblüter ein annähernd doppelt so hohes Infektionsrisiko für equine Influenza während eines Ausbruches im Jahr 2003 in Newmarket aufwiesen (BARQUERO et al., 2007) und dass zufällig beprobte weibliche Vollblüter einen höheren SRH-Antikörperwert aufwiesen als männliche Tiere (RYAN et al., 2015).

#### 5.7. Verlauf der Antikörpertiter der Pferde in Folge der Impfung

Allgemein zeigten die Ergebnisse dieser Studie, dass nahezu alle Pferde nach der Impfung einen höheren Antikörpertiter gegen Influenza hatten als davor, also auf die Immunisierung wie gewünscht reagierten. Lediglich drei Pferde reagierten nicht wie erwartet auf die Impfung und der SRH-Wert-Anstieg blieb unter 25 mm<sup>2</sup>. Diese drei Pferde gehörten der Gruppe an, die mit Proteq Flu TE<sup>®</sup> geimpft wurden, allerdings ist dies kein statistisch signifikantes Ergebnis. Es wurden keine anderen Faktoren festgestellt, die diese Pferde gemeinsam hatten und einen Einfluss auf dieses Ergebnis haben könnten. Es ist bekannt, dass es im Zuge von Immunisierungen immer wieder sogenannte „poor responders“ gibt, die keinen adäquaten Impfschutz ausbilden. Um den Impferfolg zu kontrollieren und einen Impfschutz eines einzelnen Individuums zu garantieren, gibt es nur eine Möglichkeit, und zwar das Messen des Antikörpertiters nach der Impfung. Ein anderer Aspekt einer Impfstrategie ist es, vor der Impfung den Antikörpertiter des Pferdes zu überprüfen und, je nach Ergebnis, erst ab einem gewissen Antikörpertiter zu impfen. Das wäre für Einzeltiere wahrscheinlich möglich, jedoch für Bestände eine zeit- und kostenintensive Angelegenheit. Ebenso würde dies nicht den Vorgaben und Richtlinien der verschiedenen Gremien

entsprechen. Allerdings wäre es als eine Option anzusehen, dass entweder eine vom Tierarzt bestätigte Impfung im vorgegebenen Zeitraum nachgewiesen werden kann, wie es im Moment erforderlich ist, oder eine von einem Labor bestätigte serologische Untersuchung mit der erforderlichen Antikörperkonzentration im Blut vorgewiesen wird. Die Pferde müssten regelmäßig Blutuntersuchungen unterzogen werden und je nach Bedarf mit einem adäquaten Impfstoff geboostert werden. Diese Strategie würde mit Sicherheit einen kontrollierten Impfschutz bieten. Stichprobenartige Untersuchungen von Beständen, wie es oft gemacht wird, machen aber wenig Sinn, um den Schutz jedes einzelnen Tieres zu gewährleisten.

Einige Pferde waren am Tag der Impfung, also zu Beginn der Studie, weder klinisch, noch virologisch geschützt. Nachdem alle Pferde der Studie einem strengen Impfgeme unterlagen und nach der Grundimmunisierung halbjährlich ihre Auffrischungsimpfung erhielten, und es sogar hier viele Pferde mit einem nicht ausreichenden Impfschutz gab, ist von einer nur jährlichen Auffrischungsimpfung dementsprechend abzuraten und zumindest eine halbjährliche erforderlich. Zu dieser Erkenntnis kamen auch schon NEWTON et al., 2000 und GILDEA et al., 2011. Es zeigte sich, wie bereits erwähnt, dass die Antikörpertiter 6 Monate und 21 Tage nach der Booster-Impfung wieder annähernd auf ihrem Ausgangswert waren. Dies stellte sich auch schon bei GILDEA et al. 2011 heraus.

#### 5.8. Wartezeit nach einer Impfung bis zum Transport eines Pferdes

Im Direktvergleich der drei verschiedenen Impfstoffe wurde festgestellt, dass der Anstieg des SRH-Wertes bei den Pferden, welche mit Proteq Flu Te<sup>®</sup> geimpft wurden, deutlich langsamer war als bei den anderen Pferden. Weiterhin entwickelten diese Pferde auch nie einen so hohen Antikörpertiter wie die restlichen Pferde. Das Ziel ist es aber, einen virologischen Schutz aufzubauen und nicht die meisten Antikörper zu bilden, was bei den Proteq Flu Te<sup>®</sup>-geimpften Pferden ebenso der Fall war. Diese Pferde sollten bestenfalls mindestens zwei Wochen vor einem Reitsportevent oder dem Transport geimpft werden, um die gewünschte Immunität zu erreichen. GILDEA et al. 2011 empfehlen sogar eine Wartezeit von 4 Wochen, um sicher zu gehen, dass die Pferde genügend Zeit hatten einen schützenden Titer zu entwickeln. Pferde aus

der Proteq Flu Te<sup>®</sup>-Gruppe hatten also einen statistisch signifikanten niedrigeren Antikörperanstieg in den ersten 21 Tagen nach der Impfung im direkten Vergleich mit Duvaxyn IE T Plus<sup>®</sup> und Equip FT<sup>®</sup> und ihr Titer war auch im gesamten Verlauf etwas niedriger. Die Impfstoffe Duvaxyn IE T Plus<sup>®</sup> und Equip FT<sup>®</sup> bildeten bei den Pferden bereits 7 Tagen nach der Booster-Impfung einen deutlichen Anstieg im SRH-Wert aus und unterschieden sich diesbezüglich untereinander auch nicht signifikant. Pferde, welche mit einem dieser Impfstoffe geimpft werden, würde man demnach ohne Bedenken bereits nach 7 Tagen transportieren können. Beide Impfstoffe entsprechen allerdings nicht den Empfehlungen der OIE und beinhalten die aktuell kursierenden Stämme nicht. Generell zeigt der Verlauf der Antikörperkonzentrationen aller Pferde einen Anstieg bis zum Tag 14 bzw. 21 und dann einen Abfall bis zum Tag 90. In diesem Zeitraum des Abfalles unterschieden sich die Gruppen auch nicht signifikant. Von Tag 90 bis Tag 201 sank der Antikörper-Titer der Pferde aus Gruppe 1 (Duvaxyn IE T Plus<sup>®</sup>) signifikant schneller als bei den Pferden aus Gruppe 3 (Proteq Flu Te<sup>®</sup>). Pferde, die mit Duvaxyn IE T Plus<sup>®</sup> geimpft wurden, bilden rasch einen sehr hohen Antikörperspiegel aus, ebenso ähnlich ist der Verlauf bei Pferden, die mit Equip FT<sup>®</sup> geimpft wurden, aber ebenso schnell fällt der Titer auch wieder ab. Bei Proteq Flu Te<sup>®</sup> bildeten die Pferde langsamer einen nicht ganz so hohen Titer, jedoch ist der Abfall konstanter und langsamer. So ähnlich waren die Beobachtungen der irischen Studie (GILDEA et al., 2011a).

Schließlich sollte, um einen immunologischen Schutz vor dem Transport aller Pferde zu gewährleisten und dabei unabhängig vom Impfstoff zu sein, mindestens 14 Tage nach einer Influenza-Impfung mit dem Transport gewartet werden.

#### 5.9.Empfehlung: Impfintervalle

Aus Sicht der aktuellen Datenlage bezüglich der Influenza-Impfung von Pferden, dürften Pferde, die eine Booster-Impfung bekommen haben, für die angegebene Immunitätsdauer von sechs Monaten im Falle einer Infektion eine zumindest mildere klinische Ausprägung zeigen und weniger Virus ausscheiden. Nach sechs Monaten steigt die Gefahr einer ausgeprägten Erkrankung deutlich an, ebenso wie die Gefahr

eines epidemischen Ausbruches im Zuge von Veranstaltungen, bei denen viele Pferde versammelt werden.

Mögliche Ansatzpunkte zur Verbesserung von Impfempfehlungen, um einen besseren Schutz der Pferde zu gewährleisten und die Gefahr eines Krankheitsausbruches zu minimieren, wären die strategische Impfung mit einer vorangegangenen serologischen Überprüfung des Immunstatus (NEWTON 2000b; GILDEA et al., 2011a,c).

Auch ein interessanter Aspekt wäre, die Impfung in Altersklassen einzuteilen. Junge Pferde brauchen Auffrischungsimpfungen in kürzeren Intervallen als ältere Pferde mit bereits langer dokumentierter Impfgeschichte (CULLINANE et al., 2011; PARK et al., 2003; NEWTON et al., 2000a). Es gibt aber noch keine genauen Angaben, ab welchem Alter oder ab der wievielten Impfdosis dies sinnvoll wäre. Dafür müssten noch genauere weitere Studien vorgenommen und retrospektiv die Impfgeschichten vieler Pferde genauer betrachtet werden.

Um sicher zu gehen, dass ein Pferd optimal geschützt ist und genügend Antikörper besitzt, müsste das Impfintervall generell verkürzt werden und das Pferd z.B. alle 3 Monate geimpft werden (GILDEA et al., 2011a). Dies ist aber auch wirtschaftlich zu überdenken, da die Pferde dann viermal pro Jahr eine Transportsperre hätten, den Nebenwirkungen einer Vakzinierung ausgesetzt sind und in dieser Zeit nicht optimal trainiert werden können bzw. nicht an Reitsportveranstaltungen teilnehmen können, ebenso wie der finanzielle Aufwand einer Impfung für den Besitzer.

Diese drei Möglichkeiten der Veränderung in der Vakzinierung von Pferden gegen equines Influenza sind aufgrund der vorliegenden Studie genauer zu überdenken.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Johanna Entenfellner

Influenza-Impfung bei Pferden: Verlauf der Antikörper-Titer nach einer Booster-Impfung und Vergleich dreier Impfstoffe

Equine Influenza ist eine nahezu weltweit verbreitete, hochansteckende, infektiöse Erkrankung des Respirationstraktes von Equiden. Sie wird ausgelöst von einem Influenza A Virus, das zur Familie der Orthomyxoviren gehört. Derzeit wird bei Influenza-Ausbrüchen der Subtyp A/H3N8 isoliert. Die Krankheit wird von der OIE überwacht und es gibt verschiedene zugelassene Impfstoffe, ebenso wie Impfeempfehlungen, die der Prophylaxe und dem Schutz vor Erkrankung dienen sollen. Dennoch kommt es immer wieder zu Ausbrüchen, aufgrund der antigenischen Veränderungen des Virus oder dem fehlenden Impfschutz der Pferde aufgrund von Impfverboten in einigen Ländern wie Japan und Australien. Pferde, die an Pferdesportveranstaltungen teilnehmen oder transportiert werden, müssen einen Impfpass mit sich führen, der den Impfvorschriften der jeweiligen Gremien entspricht. Es gibt jedoch noch keine einheitlichen Angaben der unterschiedlichen Gremien. Es war das Ziel der hier vorliegenden Studie, Grundlagen für einheitliche Empfehlungen zu erarbeiten.

In dieser Studie wurde die serologische Immunantwort von Warmblutpferden auf einem deutschen Gestüt nach der halbjährlichen Auffrischungsimpfung gegen equines Influenza geprüft. Ebenso wurden drei in Deutschland zugelassene Impfstoffe unterschiedlicher Technologien verglichen. Insgesamt wurden 104 Pferde in die Studie miteingeschlossen und randomisiert zu gleichen Teilen den drei Impfstoffen zugeteilt. Den Pferden wurde aus einer Jugularvene Blut entnommen und unmittelbar danach wurden die Pferde mit dem ihnen zugeteilten Impfstoff i.m. geimpft. Es folgten weitere neun Blutabnahmen über einen Zeitraum von 201 Tagen (6 Monate + 21 Tage). Die Antikörpertiter wurden anschließend in einem spezialisierten Labor mittels SRH-Test bestimmt und die Ergebnisse ausgewertet.

Alle verwendeten Impfstoffe erzeugten einen Antikörperanstieg bei allen Pferden. Nach 201 Tagen hatten fast alle Pferde wieder ihren Ausgangs-Antikörpertiter erreicht.

Daraus ergibt sich die Empfehlung, Booster-Impfungen mindestens halbjährlich vorzunehmen.

Bei zwei der drei Impfstoffe (Duvaxyn IE T Plus<sup>®</sup> und Equip FT<sup>®</sup>) stiegen die Antikörper innerhalb der ersten 7 Tage deutlich und dann sogar noch weitere 7 Tage an. Ab 14 Tage nach der Impfung wurde bei diesen Pferden ein stetiger Abfall bis zum Ende der Studie beobachtet. Einer der verwendeten Impfstoffe (Proteq Flu Te<sup>®</sup>) hat innerhalb der ersten 7 Tage nur einen sehr geringen Anstieg der Antikörpertiter in den Pferden erzielt und erst 14 Tage nach der Impfung konnte eine schützende Immunantwort nachgewiesen werden. Allerdings ist dies der einzige Impfstoff, der die von der OIE empfohlenen, aktuell kursierenden Virusstämme beinhaltet. Die Pferde, die mit ProteqFlu Te<sup>®</sup> geimpft wurden, zeigten in den ersten 21 Tagen nach der Impfung einen statistisch signifikanten niedrigeren Anstieg der Antikörper gegen H3N8, jedoch waren auch diese Pferde klinisch nach der Impfung geschützt und ab 14 Tage nach der Impfung ebenso teilweise virologisch. Laut den Empfehlungen der OIE würden diese Pferde im Falle eines Ausbruches am ehesten vor einer Infektion geschützt werden. Pferde, die mit Duvaxyn IE T Plus<sup>®</sup> oder Equip FT<sup>®</sup> geimpft wurden, zeigten eine schnellere Immunantwort bereits an Tag 7 nach der Impfung. Allgemein zeigt diese Studie, dass der Anstieg der Antikörpertiter in den ersten 21 Tagen nach der Impfung umso höher ist, je öfter die Pferde bereits geimpft wurden, je älter die Pferde sind, je kürzer der Zeitraum zur letzten Impfung und je höher ihr Ausgangstiter war. Es gab keinen signifikanten Unterschied der einzelnen Gruppen hinsichtlich der lokalen Reaktionen an der Injektionsstelle.

Aufgrund der unterschiedlichen Technologien der zugelassenen Impfstoffe wurden zumindest in dem zu beobachtenden Zeitraum innerhalb der ersten 21 Tage nach der Impfung unterschiedliche Immunantworten erkannt. Unterschiedliche Impfstoffe bedingen demnach unterschiedliche Wartezeiten des Transports der Tiere nach der Impfung. Abschließend zeigt diese Studie, dass eine halbjährliche oder eventuell noch häufigere Booster-Impfung der Pferde mit einem Impfstoff, der den aktuellen Empfehlungen der OIE entspricht, notwendig ist, um den optimalen immunologischen Schutz zu gewährleisten.

## 7. SUMMARY

Johanna Entenfellner

Equine Influenza Vaccination: Antibody titres after Booster-Vaccination and comparison of three different vaccines

Equine Influenza is a highly contagious infectious disease of the respiratory tract of equidae that has virtually spread all over the world. It is caused by an influenza A virus, which belongs to the family of Orthomyxoviridae, the subtypes A/H7N7 and A/H3N8. The disease is monitored by the OIE [*World Organisation for Animal Health*] and there are different authorised vaccines, as well as vaccination recommendations, which function as prophylaxis and aim to provide protection against disease. Nevertheless, outbreaks continue to persist, due to the antigenic changes of the virus and the lack of vaccination protection of horses in some countries such as Australia and Japan. Horses which participate in equestrian sporting events or are transported, must have a vaccination that adheres to vaccination regulations of the respective authorities. However, no uniform information of the different authorities exists. The aim of this study was to provide information in order to establish evidence-based rules.

This study therefore examined the humoral immune response of warm-blooded horses on a German stud after the half-yearly vaccination booster against Equine Influenza. Three vaccines of varying technologies authorised in Germany were compared. In total, 104 horses were included in the study and randomly allocated in equal parts to the three vaccines. Blood was taken from the horse's jugular vein and the horses were then immediately vaccinated with their allocated vaccine. A further 9 blood samples were taken over a period of 201 days (6 months + 21 days). The antibody titres were subsequently determined in a specialised laboratory by means of an SRH test and the results were analysed.

All vaccines induced a rise of the antibody titer in the horses. After 201 days, almost all horses had once again reached the pre-vaccination-level of their antibody titres, which suggests that a half-yearly booster vaccination for horses is a minimum requirement.

For two of the three vaccines (Duvaxyn IE T Plus<sup>®</sup> and Equip FT<sup>®</sup>), the antibodies increased significantly within the first seven days after vaccination and then further still for an additional 7 days. After 14 days following the vaccination, a continuous decrease of antibodies in these horses until the end of the study was observed. Only one of the vaccines used (Proteq Flu Te<sup>®</sup>) showed a very slow increase of antibody titres in the horses within the first 7 days and an effective immune response could only be proven 14 days after the vaccination. However, this is the only vaccine recommended by the OIE that contains virus strains currently circulating. The horses that were vaccinated with ProteqFlu Te<sup>®</sup> displayed, within the first 21 days after the vaccination, a statistically significant lower increase in antibodies against H3N8. However, these horses were also clinically protected following the vaccination and after 14 days following the vaccination, they were also partly virologically protected. Following the recommendations of the OIE, these horses are most likely protected against infection in the event of an outbreak. Horses, which were vaccinated with Duvaxyn IE T Plus<sup>®</sup> or Equip FT<sup>®</sup>, displayed a quicker immune response at day 7 after the vaccination, yet this rapidly decreased again. In general, this study shows that the increase of antibody titres in the first 21 days after the vaccination has been all the more higher, the more times the horse has already been vaccinated, the older the horse has been, the shorter the time frame from the last vaccination has been and the higher its pre-vaccination titre. There was no significant difference in the vaccine groups regarding the local reactions at the injection site.

In light of the various technologies of the authorised vaccines, the rise of antibody titre differs, at least in within the first 21 days after the vaccination. However, different vaccines require different waiting times in terms of transporting animals after the vaccination. In conclusion, this study shows that a half-yearly or possibly more frequent booster vaccination of horses is necessary. This corresponds to current recommendations made by the OIE, in order to guarantee optimal immunological protection.

## 8.LITERATURVERZEICHNIS

ABDEL-MONEIM A. S., ABDEL-GHANY A. E., SHANY S. A. (2010): Isolation and characterization of highly pathogenic avian influenza virus subtype H5N1 from donkeys. *Journal of Biomechanical Science* 17, 25.

AESCHBACHER S., SANTSCI E., GERBER V., STALDER H. P., ZANONI R. G. (2015): Entwicklung einer real-time RT-PCR zum Nachweis von equinem Influenzavirus. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* Band 157, Heft 4, 191-201.

ALEXANDER D. J., BROWN I. H. (2000): Recent zoonoses caused by influenza A viruses. *Revue scientifique et technique Office International of Epizootics* 19, 197-225.

ANDINO R., DOMINGO E. (2015): Viral quasispecies. *Virology* 479-480, 46-51

ANON (2012): Equine influenza. In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Vol 2. 7<sup>th</sup> edn. Chapter 2. 5. 7, Office international Des Epizooties (OIE), 14pp.

ARAGON T., DE LA LUNA S., NOVOA I., CARRASCO L., ORTIN J., NIETO A. (2000): Eukaryotic translation initiation factor 4GI is a cellular target for NS1 protein, a translation activator of influenza virus. *Molecular and Cellular Biology* 20, 6259-6268.

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

BEECH J. (1991): Infections caused by viruses. *Equine Respiratory Disorders*, Philadelphia, PA, Lea and Febiger, p. p. 153-180.

BRYANT N. A., RASH A. S., RUSSELL C. A., ROSS J., COOKE A., BOWMAN S., MACRAE S., LEWIS N. S., PAILLOT R., ZANONI R., MEIER H., GRIFFITHS L.A., DALY J.M., TIWARI A., CHAMBERS T. M., NEWTON J. R., ELTON D. M. (2009): Antigenetic and genetic variations in European and North American equine influenza virus strains (H3N8) isolated from 2006 to 2007. *Veterinary Microbiology* 138, 41-52.

BRYANT N. A., RASH A. S., WOODWARD A. L., MEDCALF E., HELWEGEN M., WOHLFENDER F., CRUZ F., HERMANN C., BORCHERS K., TIWARI A., CHAMBERS T. M., NEWTON J. R., MUMFORD J. A., ELTON D. M. (2011): Isolation and characterisation of equine influenza viruses (H3N8) from Europe and North America from 2008 to 2009. *Veterinary Microbiology* 147, 19-27.

CALLINAN I. (2008): Equine Influenza: The August 2007 outbreak in Australia. Commonwealth of Australia ([www.equineinfluenzainquiry.gov.au](http://www.equineinfluenzainquiry.gov.au)).

CHAMBERS T. M., SHORTRIDGE K. F., LI P. H., POWELL D. G., WATKINS K. L. (1994): Rapid diagnosis of equine influenza by the Directigen FLU-A enzyme immunoassay. *Veterinary Record* 135, 275-279.

CRAWFORD P. C., DUBOVI E. J., CASTLEMAN W. L., STEPHENSON I., GIBBS E. P., CHEN L., SMITH C., HILL R. C., FERRO P., POMPEY J., BRIGHT R. A., MEDINA M. J., JOHNSON C. M., OLSEN C. M., COX N. J., KLIMOV A. I., KATZ J. M., DONIS R. O. (2005): Transmission of equine influenza virus to dogs. *Science*, 310, 482-485.

CULLINANE A., WELD J., OSBORNE M., NELLY M., MC BRIDE C., WALSH C. (2001): Field studies on equine influenza vaccination regimes in thoroughbred foals and yearlings. *Veterinary Journal* 161(2), 174-85.

CULLINANE A., ELTON D., MUMFORD J. (2010): Equine influenza-surveillance and control. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 4 (6), 339-44.

CULLINANE A., NEWTON J. R. (2013): Equine Influenza - A global perspective. *Veterinary Microbiology* 167, 205-214.

DALY J. M., LAI A. C., BINNS M. M., CHAMBERS T. M., BARRANDEGUY M., MUMFORD J. A. (1996): Antigenic and genetic evolution of equine H3N8 influenza A viruses. *Journal of General Virology* 77 (Pt 4) 661-671.

DALY J. M., YATES P. J., NEWTON J. R., PARK A., HENLEY W., WOOD J. L., POYNTER N. D., MUMFORD J. A. (2004): Evidence supporting the inclusion of strains from each of the two co-circulating lineages of H3N8 equine influenza virus in vaccines. *Vaccine* 22 (29-30), 4101-9.

DALY J. M., WHITWELL K. E., MILLER J., DOWD G., CARDWELL J. M., SMITH K. C. (2006): Investigation of equine influenza cases exhibiting neurological disease: coincidence or association? *Journal of Comparative Pathology* 134, 231-235.

DALY J. M., SINDLE T., TEARLE J., BARQUERO N., NEWTON J. R., CORNING S. (2007a): Equine influenza vaccine containing older H3N8 strains offers protection against A/eq/South Africa/4/03 (H3N8) strain in a short-term vaccine efficacy study. *Equine Veterinary Journal* 39, 446-50.

DALY J., DAAS A., BEHR-GROSS M. E. (2007b): Collaborative study for the establishment of a candidate equine influenza subtype 2 American-like-strain A/eq/South Africa/4/03-horse antiserum biological reference preparation. *Pharmeuropa Bio* 1, 7-14.

DALY J. M., NEWTON J. R., WOOD J. L. N., PARK A. W. (2013): What can mathematical models bring to the control of equine influenza? *Equine Veterinary Journal* 45, 784-788.

DAMIANI A. M., SCICLUNA M. T., CIABATTI I., CARDETI G., SALA M., VULCANO G., CORDIOLI P., MARTELLA V., AMADDEO D., AUTORINO G. L. (2008): Genetic characterization of equine influenza viruses isolated in Italy between 1999 and 2005. *Virus Research* 131, 100-105.

ELTON D., CULLINANE A. (2013): Equine influenza: antigenic drift and implications for vaccines. *Equine Veterinary Journal* 45, 768-769.

EL-HAGE C. M., SAVAGE C. J., MINKE J. M., FICORILLI N. P., WATSON J., GILKERSON J. R. (2013): Accelerated vaccination schedule provides protective levels of antibody and complete herd immunity to equine influenza. *Equine Veterinary Journal* 45, 235-9.

FAVARO P. F., FERNANDES W. R., REISCHAK D., BRANDÃO P. E., OLIVEIRA DE SOUZA SILVA S., RICHTZENHAIN L. J. (2017): Evolution of equine influenza viruses (H3N8) during a Brazilian Outbreak, 2015. *Brazilian Journal of Microbiology*, accepted 2017, available online

FERNANDEZ-SESMA A., MARUKIAN S., EBERSOLE B. J., KAMINSKI D., PARK M. S., YUEN T., SEALFON S. C., GRACÍA-SASTRE A., MORAN T. M. (2006): Influenza virus evades innate and adaptive immunity via the NS1 protein. *Journal of Virology*, 80: 6295-304.

GAGNON C. A., ELAHI S. M., TREMBLAY D., LAVOIE J. P., BRYANT N. A., ELTON D. M., CARMAN S., ELSENER J. (2007): Genetic relatedness of recent Canadian equine influenza virus isolates with vaccine strains used in the field. *The Canadian Veterinary Journal* 48, 1028-1030.

GALVIN P., GILDEA S., ARKINS S., WALSH C., CULLINANE A. (2013): The evaluation of a nucleoprotein ELISA for the detection of equine influenza antibodies and the differentiation of infected from vaccinated horses (DIVA). *Influenza and Other Respiratory Viruses* 7 (Suppl. 4), 73-80.

GALVIN P., GILDEA S., NELLY M., QUINLIVAN M., ARKINS S., WALSH C., CULLINANE A. (2014): The evaluation of three diagnostic tests for the detection of equine influenza nucleoprotein in nasal swabs. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 8 (3), 376-383.

GARCÍA-SASTRE A., EGOROV A., MATASSOV D., BRANDT S., LEVY D. E., DURBIN J. E., PALESE P., MUSTER T. (1998): Influenza A virus lacking NS1 gene replicates in interferon-deficient system. *Virology*, 525: 324-30.

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. *Preventive Veterinary Medicine* 99, 15-27.

GEISS G. K., SALVATORE M., TUMPEY T. M., CARTER V. S., WANG X., BASLER C. F., TAUBENBERGER J. K., BUMGARNER R. E., PALESE P., KATZE M. G., GARCÍA-SASTRE A. (2002): Cellular transcriptional profiling in influenza a virus-infected lung epithelial cells: The role of the nonstructural NS1 protein in the evasion of the host innate defense and its potential contribution to pandemic influenza. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 10736-10741.

GILDEA S., ARKINS S., CULLINANE A. (2010): A comparative antibody study of the potential susceptibility of Thoroughbred and non-Thoroughbred horse populations in Ireland to equine influenza virus. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 4 (6), 363-372.

GILDEA S., ARKINS S., WALSH C., CULLINANE A. (2011a): A comparison of antibody responses to commercial equine influenza vaccines following annual booster vaccination of National Hunt Horses – a randomised blind study. *Vaccine* 29, 3917-3922.

GILDEA S., ARKINS S., WALSH C., CULLINANE A. (2011b): A comparison of antibody responses to commercial equine influenza vaccines following primary vaccination of Thoroughbred weanlings-A randomized blind study. *Vaccine* 29, 9214-9223.

GILDEA S., ARKINS S., CULLINANE A. (2011c): Management and environmental factors involved in equine influenza outbreaks in Ireland 2007-2010. *Equine Veterinary Journal* 43 (5), 608-617.

GILDEA S., QUINLIVAN M., ARKINS S., CULLINANE A. (2012): The molecular epidemiology of equine influenza in Ireland from 2007-2010 and its international significance. *Equine Veterinary Journal* 44, 387-92.

GILDEA S., FITZPATRICK D. A., CULLINANE A. (2013): Epidemiological and virological investigations of equine influenza outbreaks in Ireland (2010-2012). *Influenza and Other Respiratory Viruses* 7 (Suppl. 4), 61-72.

GILDEA S., JOSE SANCHEZ HIGGINS M., JOHNSON G., WALSH C., CULLINANE A. (2016): Concurrent vaccination against equine influenza and equine herpesvirus-a practical approach. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 10(5), 433-437.

GLASS K., WOOD J. L., MUMFORD J. A., JESSET D., GRENFELL B. T. (2002): Modelling equine influenza 1: a stochastic model of within-yard epidemics. *Epidemiology and Infection* 128, 491-502.

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 Veterinary Journal* 30, 489-497.

HALE B. G., RANDALL R. E., ORTIN J., JACKSON D. (2008): The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *Journal of General Virology*, 89: 2359-76.

HAMPSON A. W., MACKENZIE J. S. (2006): The influenza viruses. *The Medical Journal of Australia*, 185 (10): 39-43.

HANNANT D., MUMFORD J. A., JESSETT D. M. (1988): Duration of circulating antibody and immunity following infection with equine influenza virus. *Veterinary Record* 122, 125-128.

HANNANT D., JESSETT D. M., O'NEILL T., MUMFORD J. A. (1989): Antibody isotype responses in the serum and respiratory tract to primary and secondary infections with equine influenza virus (H3N8). *Veterinary Microbiology* 19, 293-303.

HANNANT D., MUMFORD J. A. (1989): Cell mediated immune responses in ponies following infection with equine influenza virus (H3N8): the influence of induction culture conditions on the properties of cytotoxic effector cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 21, 327-337.

HAY A. J., LOMNICZI B., BELLAMY A. R., SKEHEL J. J. (1977): Transcription of the influenza virus genome. *Virology* 83, 337-335.

ITO M., NAGAI M., HAYAKAWA Y., KOMAE H., MURAKAMI N., YOTSUYA S., ASAKURA S., SAKODA Y., KIDA H. (2008): Genetic analysis of an H3N8 influenza virus isolate, causative strain of the outbreak of equine influenza at the Kanazawa racecourse in Japan in 2007. *Journal of Veterinary Medical Science* 70, 899-906.

JANEWAY C. A. Jr., TRAVERS P., WALPORT M., SHLOMCHIK M. (2005): Immunology. 5. Auflage, Spektrum Verlag.

KASTNER S. B., HAINES D. M., ARCHER J., TOWNSEND H. G. (1999): Investigations on the ability of clenbuterol hydrochloride to reduce clinical signs and inflammation associated with equine Influenza A infection. *Equine Veterinary Journal* 31, 160-168.

KAUFMANN W. R., NUTALL P. A. (2003): *Rhipicephalus appendiculatus* (Acari: Ixodidae): dynamics of Thogoto virus infection in female ticks during feeding on guinea pigs. *Experimental Parasitology* Vol. 104 p. 20-25.

KU K. B., PARK E. H., YUM J., KIM J. A., OH S. K., SEO S. H. (2014): Highly Pathogenic Avian Influenza A (H5N8) Virus from Waterfowl, South Korea, 2014. *Emerging Infectious Diseases* 20 (9), 1587-1588.

KING E. L., MACDONALD D. (2004): Report of the Board of Inquiry appointed by the Board of the National Horseracing Authority to conduct enquiry into the causes of the equine influenza which started in the Western cape in early December 2003 and spread to the Eastern cape and Gauteng. *Australian Equine Veterinary* 23, 139-142.

KIRKLAND P. D., DAVIS R. J., WONG D., RYAN D., HART K., CORNEY B., HEWITSON G., COOPER K., BIDDLE A., EASTWOOD S., SLATTERY S., RAYWARD D., EVERS M., WRIGHT T., HALPIN K., SELLECK P., WATSON J. (2011): The first five days: field and laboratory investigations during the early stages of the equine influenza outbreak in Australia, 2007. *Australian Veterinary Journal* 89 (Suppl. 1) 6-10.

LAI A. C., CHAMBERS T. M., HOLLAND JR. R. E., MORLEY P. S., HAINES D. M., TOWNSEND H. G., BARRANDEGUY M. (2001): Diverged evolution of recent equine-2 influenza (H3N8) viruses in the Western Hemisphere. *Archives of Virology* 146, 1063-1074

LEWIS N. S., DALY J. M., RUSSELL C. A., HORTON D. L., SKEPNER E., BRYANT N. A., BURKE D. F., RASH A. S., WOOD J. L., CHAMBERS T. M., FOUCHIER R. A. M., MUMFORD J. A., ELTON D.M., SMITH D. J. (2011): Antigenic and Genetic Evolution of Equine Influenza A (H3N8) Virus from 1968 to 2007. *Journal of Virology* 85 (23), 12742-12749

LU Z., CHAMBERS T. M., BOLIAR S., BRANSCUM A. J., STURGILL T. L., TIMONEY P. J., REEDY S. E., TUDOR L. R., DUBOVI E. J., VICKERS M. L., SELLS S., BALASURIYA U.B. (2009): Development and evaluation of one-step TaqMan real-time reverse transcription-PCR assays targeting nucleoprotein, matrix and hemagglutinin genes of equine influenza virus. *Journal of Clinical Microbiology* 47, 3907-3913.

MARCUS P. L., ROJEK J. I., SEKELLICK M. J. (2005): Interferon induction and/or production and its suppression by influenza A viruses. *Journal of Virology*, 79 (5): 2880-2890.

MARTINEZ O., TSIBANE T., BASLER C. F. (2009): Neutralizing anti-influenza virus monoclonal antibodies: therapeutics and tools for discovery. *International Reviews of Immunology*, 28 (1): 69-92.

MATROSOVICH M. N., MATROSOVICH T. Y., GRAY T., ROBERTS N. A., KLENK H. D. (2004): Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. *Journal of Virology* 78, 12665-7.

MUMFORD J. A., HANNANT D., JESSETT D. M. (1990): Experimental infection of ponies with equine influenza (H3N8) viruses by intranasal inoculation or exposure to aerosols. *Equine Veterinary Journal* 22, 93-98.

MUMFORD J. A., WOOD J. (1992a): Establishing an acceptability threshold for equine influenza vaccines. *Developments in biological standardization* 79, 137-46.

MUMFORD J. A. (1992b): Respiratory viral disease. *Current therapy in equine medicine* p. p. 316-324.

MUMFORD J. A., JESSETT D., DUNLEAVY U., WOOD J., HANNANT D., SUNDQUIST B., COOK R. F. (1994a): Antigenicity and immunogenicity of experimental equine influenza ISCOM vaccines. *Vaccine* 12, 857-863.

MUMFORD J. A., WILSON H., HANNANT D., JESSETT D. M. (1994b): Antigenicity and immunogenicity of equine influenza vaccines containing a Carbomer adjuvant. *Epidemiology and infection* 112, 421-437.

MUMFORD J. A., JESSETT D. M., ROLLINSON E. A., HANNANT D., DRAPER M. E. (1994c): Duration of protective efficacy of equine influenza immunostimulating complex/tetanus vaccines. *Veterinary Record* 134 (7), 158-62.

MUMFORD J. (2000): Collaborative study for the establishment of three European Pharmacopoeia Biological Reference Preparations for equine influenza horse antiserum. *Pharmeuropa* 7-21.

MUMFORD J. A. (2001): *Biology Epidemiology and Vaccinology of Equine Influenza. Quality Control of Equine Influenza Vaccines.*

Session 1 – Proceedings of the international Symposium organized by the European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM), Budapest, Dec. 2001.

MUMFORD J. A., ELTON D. M., SMITH D. J. (2011): Antigenic and genetic evolution of equine Influenza A (H3N8) from 1968 to 2007. *Journal of Virology* 85, 12742-9.

MURASKO D. M., BERNSTEIN E. D., GARDENER E. M., GROSS P., MUNK G., DRAN S., ABRUTYN E. (2002): Role of humoral and cell-mediated immunity in protection from influenza disease after immunization of healthy elderly. *Experimental Gerontology* 37, 427-439.

MOREIN B., BENGTSSON K. L. (1999): Immunomodulation by iscoms, immune stimulating complexes. *Methods* 19, 94-102.

MORLEY P. S., GROSS D. K., FRENCH P. S., GOCLAN S. A., LAUDERDALE M. (1998): Exercise and influenza virus infections in horses. 8<sup>th</sup> International Conference on Equine Infectious Diseases, Dubai, p. p. 57-63.

MOSS P. (2003): Cellular immune responses to influenza. *Developmental Biology* 115, 31-37.

MYERS C., Wilson W. D. (2006): Equine Influenza Virus. *Clinical Techniques in Equine Practice* 5: 187-196.

NELSON K. M., SCHRAM B. R., MCGREGOR M. W., SHEORAN A. S., OLSEN C. W., LUNN D. P. (1998): Local and systemic isotype-specific antibody responses to equine influenza virus infection versus conventional vaccination. *Vaccine* 16, 1306-1313.

NEWTON J. R., VERHEYEN K., WOOD J. L., YATES P. J., MUMFORD J. A. (1999): Equine Influenza in the United Kingdom in 1998. *Veterinary Record* 145, 449-452.

NEWTON J. R., LAKHANI K. R., WOOD J. L. N., BAKER D. J. (2000a): Risk factors for equine influenza serum antibody titres in young Thoroughbred racehorses given an inactivated vaccine. *Preventive Veterinary Medicine* 46, 129-41.

NEWTON J. R., TOWNSEND H. G., WOOD J. L., SINCLAIR R., HANNANT D., MUMFORD J. A. (2000b): Immunity to equine influenza: relationship of vaccine-induced antibody in young Thoroughbred racehorses to protection against field infection with influenza A/equine-2 viruses (H3N8). *Equine Veterinary Journal* 32 (1), 65-74.

NEWTON J. R., DALY J. M., SPENCER L., MUMFORD J. A. (2006): Description of the outbreak of equine influenza (H3N8) in the United Kingdom in 2003, during which recently vaccinated horses in Newmarket developed respiratory disease. *Veterinary Record* 158, 185-192

OIE Expert Surveillance Panel on Equine Influenza Vaccine Composition (2014). *Conclusions and Recommendations*. *OIE Bulletins* 2: 77-79.

OIE (2016): *Equine Influenza. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. World Organisation for Animal Health, Paris, 2016.

OIE (2017): *OIE Expert Surveillance Panel on Equine Influenza Vaccine Composition: Conclusions and Recommendations*. [www.oie.int](http://www.oie.int).

PARDO J., AQUILLO J. I., ANEL A. MARTIN P., JOECKEL L., BORNER C., WALLICH R., MÜLLBACHER A., FROELICH C. J., SIMON M. M. (2009): The biology of cytotoxic cell granule exocytosis pathway: granzymes have evolved to induce cell death and inflammation. *Microbes and Infection* 11 (4): 452-459.

PARK A. W., WOOD J. L., NEWTON J. R., DALY J., MUMFORD J. A., GRENFELL B. T. (2003): Optimising vaccination strategies in equine influenza. *Vaccine* 21 (21-22), 2862-70.

PARK A. W., WOOD J. L., DALY J. M., NEWTON J. R., GLASS K., HENLEY W., MUMFORD J. A., GRENFELL B. T. (2004): The effects of strain heterology on the epidemiology of equine influenza in a vaccinated population. *Proceedings. Biological Sciences* 271, 1547-1555.

PAILLOT R., KYDD J. H., SINDLE T., HANNANT D., EDLUND TOULEMONDE C., AUDONNET J. C., MINKE J. M., DALY J. M. (2006): Antibody and IFN-gamma responses induced by a recombinant canarypox vaccine and challenge infection with equine influenza virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 112, 225-233.

PAILLOT R., KYDD J. H., MACRAE S., MINKE J. M., HANNANT D., DALY J. M. (2007): New assays to measure equine influenza virus-specific Type 1 immunity in horses. *Vaccine* 25, 7385-7398.

PAILLOT R., GRIMMETT H., ELTON D., DALY J. M. (2008): Protection, systemic IFN and antibody responses induced by an ISCOM-based vaccine against a recent equine influenza virus in its natural host. *Veterinary Research* 39. 21.

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. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 136, 272-83.

PAILLOT R., PROWSE L. (2012): ISCOM-matrix-based equine influenza (EIV) vaccine stimulates cell-mediated immunity in the horse. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 145, 516-521.

PAILLOT R., PROWSE L., MONTESSO F., HUANG C. M., BARNES H., ESCALA J. (2013): Whole inactivated equine influenza vaccine: Efficacy against a representative clade 2 equine influenza virus, IFN $\gamma$  synthesis and duration of humoral immunity. *Veterinary Microbiology* 162, 396-407.

PAILLOT R., RASH N. L., GARRETT D., PROWSE-DAVIS L., MONTESSO F., CULLINANE A., LEMAITRE L., THIBAUT J.C., WITTRECK S., DANCER A. (2016): How to Meet the Last OIE Expert Surveillance Panel Recommendations on Equine Influenza (EI) Vaccine Composition: A Review of the Process Required for the Recombinant Canarypox-Based EI Vaccine. *Pathogens* 5, 64.

PATTERSON-KANE J. C., CARRICK J. B., AXON J. E., WILKIE I., BEGG A. P. (2008): The pathology of bronchointerstitial pneumonia in young foals associated with the first outbreak of equine influenza in Australia. *Equine Veterinary Journal*, 40, 199-203.

POUWELS H. G. W., VAN DE ZANDE S. M. A., HORSPOOL L. J. I., HOEIJMAKERS M. J. H. (2014): Efficacy of a non-updated, Matrix-C-based equine influenza subunit-tetanus vaccine following Florida sublineage clade 2 challenge. *Veterinary Record* doi: 10. 1136/vr. 101993.

QUI T., GUO W., HUANG W. Q., LI H. M., ZHAO L. P., DAI L. L., HE N., HAO X. F., XIANG W. H. (2010): Genetic evolution of equine influenza viruses isolated in China. *Archives of Virology* 155, 1425-1432.

QUINLIVAN M., CULLINANE A., NELLY M., VAN MAANEN K., HELDENS J., ARKINS S. (2004): Comparison of sensitivities of virus isolation, antigen detection, and nucleic acid amplification for detection of equine influenza virus. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 759-763.

QUINLIVAN M., DEMPSEY E., RYAN F., ARKINS S., CULLINANE A. (2005): Real-time reverse transcription PCR for detection and quantitative analysis of equine influenza virus. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 5055-5057.

RASH A., MORTON R., WOODWARD A., MAES O., MACCAULEY J., BRYANT N., ELTON D. (2017): Evolution and Divergence of H3N8 Equine Influenza Viruses Circulating in the United Kingdom from 2013 to 2015. *Pathogens* 6,6.

RESA-INFANTE P., JORBA N., COLOMA R., ORTÍN J., (2011): The influenza virus RNA synthesis machine: Advances in its structure and function. *RNA Biol* 8, 207-215.

RYAN M., GILDEA S., WALSH C., CULLINANE A. (2015): The impact of different equine influenza vaccine products and other factors on equine influenza antibody levels in Thoroughbred racehorses. *Equine Veterinary Journal* 47, 662-666.

SAITO T., KAWAOKA Y., WEBSTER R. G. (1993): Phylogenetic analysis of the N8 neuraminidase gene of Influenza A Viruses. *Virology* 193:868-876

SETO J. T., ROTT R. (1966): Functional significance of sialidase during influenza virus multiplication. *Virology* 30, 731-7.

SI-TAHAR M., TOUQUI L., CHIGNARD M. (2009): Innate immunity and inflammation: two facets of the same anti-infectious reaction. *Clinical and Experimental Immunology*, 156 (2): 194-8.

SJOLANDER A., VAN'T LAND B., BENGTSSON K. L. (1997): Iscoms containing purified Quillaja saponins upregulate both Th1-like and Th2-like immune responses. *Cellular Immunology* 177, 69-76.

SJOLANDER A., COX J. C., BARR I. G. (1998): ISCOM's: an adjuvant with multiple functions. *Journal of Leukocyte Biology* 64, 713-723.

SKEHEL J. J., WILEY D. C. (2000): Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annual Review of Biochemistry* 69, 531-569.

SLATER J., HANNANT D. (2000): Equine immunity to viruses. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 16, 49-68.

SOLOLANZO A., WEBBY R. J., LAGER K. M., JANKE B. H., GARCIA-SASTRE A., RICHT J. A. (2005): Mutations in the ns1 protein of swine influenza virus impair anti-interferon activity and confer attenuation in pigs. *Journal of Virology* 79, 7535-7543.

SOVINOVA O., TUMOVA B., POUSKA F., NEMEC J. (1958): Isolation of a virus causing respiratory disease in horses. *Acta Virology* 2:52-61.

Ständige Impfkommission am Friedrich-Loeffler-Institut (31.3.2017): Stellungnahme zur Immunisierung von Pferden gegen Equine Influenza

STUDDERT M. J. (1996): Orthomyxoviridae. *Virus Infections of Equines*. Elsevier Science p. p. 281-284

TONG S., ZHU X., LI Y., SHI M., ZHANG J., BOURGEOIS M., YANG H., CHEN X., RECUENCO S., GOMEZ J., CHEN L-M., JOHNSON A., TAO Y., DREYFUS C., YU W., MCBRIDE R., CARNEY P. J., GILBERT A. T., CHANG J., GUO Z., DAVIS C. T., PAULSON J. C., STEVENS J., RUPPRECHT C. E., HOLMES E. C., WILSON I. A., DONIS R. O. (2013): New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses. *Plos Pathogens* 9 (10): e1003657.

VAN MAANEN C., CULLINANE A. (2002): Equine influenza virus infections: an update. *Vet Q* 24: 79-94.

VIRMANI N., BERA B. C., SINGH B. K., SHANMUGASUNDARAM K., GULATI B. R., BARUA S., VAID R. K., GUPTA A. K., SINGH R. K. (2010): Equine influenza outbreak in India (2008-09): virus isolation, sero- epidemiology and phylogenetic analysis of HA gene. *Veterinary Microbiology* 143, 224-237.

WADDELL G. H., TEIGLAND M. B., SIGEL M. M. (1963): A new influenza virus associated with equine respiratory disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 143, 587-590.

WATSON J., HALPIN K., SELLECK P., AXELL A., BRUCE K., HANSSON E., HAMMOND J., DANIELS P., JEGGO M. (2011): Isolation and characterization of an H3N8 equine influenza virus in Australia, 2007. *Australian Veterinary Journal* 89 (Suppl. 1) 35-37.

WATTRANG E., JESSETT D. M., YATES P., FUXLER L., HANNANT D. (2003): Experimental infection of ponies with equine Influenza A2 (H3N8) virus strains of different pathogenicity elicits varying interferon and interleukin-6 responses. *Viral Immunology* 16, 57-67.

WEBSTER R. G., GUO Y. J. (1991): New Influenza virus in horses. *Nature* 351, 527.

WEBSTER R. G., BEAN W. J., GORMAN O. T., CHAMBERS T. M., KAWAOKA Y. (1992): Evolution and Ecology of Influenza A Viruses. *Microbiological Reviews* Vol. 56, No. 1 p. 152-179.

WEBSTER R. G. (1993): Are equine 1 influenza viruses still present in horses? *Equine Veterinary Journal* 25 (6) p. 537-538.

WILLOUGHBY R., ECKER G., MCKEE S., RIDDOLLS L., VERNAILLEN C., DUBOVI E., LEIN D., MAHONY J. B., CHERNESKY M., NAGY E. (1992): The effects of equine rhinovirus, influenza virus and herpesvirus infection on tracheal clearance rate in horses. *Canadian Journal of Veterinary Research* 56, 115-121.

WILSON W. D. (1993): Equine influenza.

*The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice* 9 (2): 257-282.

WILSON W. D., MIHALYI J. E., HUSSEY S., LUNN D. P. (2001): Passive transfer of maternal immunoglobulin isotype antibodies against tetanus and influenza and their effect on the response of foals to vaccination. *Equine Veterinary Journal* 33 (7), 644-650.

WOOD J. L. N. (1991): A review of the history and epidemiology and a description of recent outbreak. University of London, London. MSc Dissertation.

WOODWARD A. L., RASH A. S., BLINMAN D., BOWMAN S., CHAMBERS T. M., DALY J. M., DAMIANI A., JOSEPH S., LEWIS N., MCCAULEY J. W., MEDCALF L., MUMFORD J., NEWTON J. R., TIWARI A., BRYANT N. A., ELTON D.M. (2014): Development of a surveillance scheme for equine influenza in the UK and characterization of viruses isolated in Europe, Dubai and the USA from 2010-2012. *Veterinary Microbiology* 169 (3-4), p. p. 113-127

WRIGHT P. F., WEBSTER R. G. (2001): Orthomyxoviruses. Philadelphia, PA, USA: Lippincott, Williams & Wilkins p. p. 1533-79

YADAV M. P., UPPAL P. K., MUMFORD J. A. (1993): Physico-chemical and biological characterization of A/Equi-2 virus isolated from 1987 equine influenza epidemic in India. *International Journal of Animal Science* 8, 93-98.

YAMANKA T., NIWA H., TSUJIMURA K., KONDO T., MATSUMURA T. (2008): Epidemic of equine influenza among vaccinated racehorses in Japan in 2007. *Journal of Veterinary Medical Science* 70, 623-625.

YAMANAKA T., NEMOTO M., BANNAI H., TSUJIMURA K., KONDO T., MATSUMURA T., MURANAKA M., UENO T., KINOSHITA Y., NIWA H., HIDARI K. I., SUZUKI T. (2012): No evidence of horizontal infection in horses kept in close contact with dogs experimentally infected with canine Influenza A virus (H3N8). *Acta Veterinaria Scandinavica* 54, 25.

YATES P., MUMFORD J. A. (2000): Equine influenza vaccine efficacy: the significance of antigenic variation. *Veterinary Microbiology* 74, 173-177.

YONDON M., HEIL G. L., BURKS J. P., ZAYAT B., WALTZEK T. B., JAMIYAN B. O., MCKENZIE P. P., KRUEGER W. S., FRIARY J. A., GRAY G. C. (2013): Isolation and characterization of H3N8 equine influenza A virus associated with the 2011 epizootic in Mongolia. *Influenza and other Respiratory Viruses* 7(5), 659-665.

## 9. ANHANG

### Gebrauchsmaterialien (Verweis von 3.1.3.)

Blutprobenentnahme: BD Microlance 18 Gauge Einmalkanülen (1,2x40mm), Braun 10 ml Spritzen, Sarstedt 10 ml Röhren zur Serumgewinnung mit Präparierungsträger und Gerinnungsaktivator

Aufbereitung: Beckman Model TJ-6 Zentrifuge, LP Italiana SPA Einmalpipetten, Eppendorf-Tubes 2,0 ml

Weitere Verarbeitung: nach dem SRH-Test Protokoll des Irish Equine Center (Kildare, IRL)

Sparks Lab Supplies 30ml und 150 ml Gefäße

Beckman Coulter Model Alegra X-12R Zentrifuge

Hettich Mikro 120 Zentrifuge

Sarstedt Petrischalen 92x16 mm mit Nocken

Thermo Electron Corporation Hepa Class 100 Inkubator

Bellco Glass Inc. Roll-In Inkubator

Envigo Meerschweinchen Kompliment

Powerpoint Engineering Mitutoyo Absolute Digimatic – digitaler Messschieber

ICN Biomedicals, Inc. 3mm Gelstanze

BDC Edwards 5/E2MP Dual Stage Rotary Vane Vakuum Pumpe

### Verwendete Lösungen für SRH-Test:

-Saline/ Hepes Lösung:	NaCl 17 g (0,85%)
	Hepes 23,6 g (0,05M)
	Natriumazid 0,4 g (0,02%)

Mit Wasser (H<sub>2</sub>O) ergänzen, bis 2 l erreicht sind und mit NaOH vermengen, bis pH Wert bei 6,5 ist

-Saline/ Hepes BSA Lösung:	Saline/ Hepes Lösung 149 ml
	Bovines Serum Albumin ca. 1 ml

Gewünschte Konzentration ist 0,2%, also im Verhältnis 1: 150

-SRH PBS:

NaCl	20 g
KCl	0,5 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	3,636 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g
Natriumazid	0,4 g

Mit Wasser (H<sub>2</sub>O) ergänzen, bis 2 l erreicht sind

-Chromium Chlorid Stock Solution (2,25M stock):

CrCl <sub>3</sub>	6,0 g
Wasser	10 ml

-Chromium Chloride Working Solution (1:400):

NaCl	0,85 g
CrCl <sub>3</sub> stock	250 mcl
Wasser (H <sub>2</sub> O)	100 ml

-1% Agarose Typ 1-A:

Agarose (10g/l) mit ausreichender bzw. erwünschten Menge SRH PBS mischen und bei mittlerer bis höchster Stufe für 3 bis 5 Minuten in die Mikrowelle geben.

Tabelle 16: Auflistung aller Pferde mit Laufnummer, Alter, Geschlecht, Alter bei V1 in Monaten, d seit letzter V, V Total, Impfstoffzuteilung und Gruppe

Pferd	Alter	Geschlecht	Alter bei V1	d seit letzter V	V Total	Impfstoffzuteilung	Gruppe
1	4	G	8	184	10	Duvaxyn IE T Plus	1
2	4	G	9	170	9	Duvaxyn IE T Plus	1
3	4	G	9	170	9	Duvaxyn IE T Plus	1
4	3	G	8	184	7	Duvaxyn IE T Plus	1
5	3	S	10	184	7	Duvaxyn IE T Plus	1
6	4	G	9	170	9	Duvaxyn IE T Plus	1
7	4	G	9	170	9	Duvaxyn IE T Plus	1
8	4	G	7	173	9	Duvaxyn IE T Plus	1
9	4	M	9	160	8	Duvaxyn IE T Plus	1
10	4	M	10	159	9	Duvaxyn IE T Plus	1
11	4	M	9	159	9	Duvaxyn IE T Plus	1
12	4	M	9	139	10	Duvaxyn IE T Plus	1
13	4	M	8	160	8	Duvaxyn IE T Plus	1
14	4	M	9	160	10	Duvaxyn IE T Plus	1
15	4	M	10	160	10	Duvaxyn IE T Plus	1
16	4	M	9	160	9	Duvaxyn IE T Plus	1
17	4	M	9	160	10	Duvaxyn IE T Plus	1
18	4	M	9	160	9	Duvaxyn IE T Plus	1
19	2	M	9	186	5	Duvaxyn IE T Plus	1
20	2	M	7	186	5	Duvaxyn IE T Plus	1
21	4	M	10	160	10	Duvaxyn IE T Plus	1
22	2	M	9	184	5	Duvaxyn IE T Plus	1
23	2	M	9	184	5	Duvaxyn IE T Plus	1
24	3	M	9	186	7	Duvaxyn IE T Plus	1
25	3	M	8	170	7	Duvaxyn IE T Plus	1
26	2	M	11	186	5	Duvaxyn IE T Plus	1
27	2	M	11	186	5	Duvaxyn IE T Plus	1
28	2	M	9	184	5	Duvaxyn IE T Plus	1
29	2	M	8	184	5	Duvaxyn IE T Plus	1
30	4	M	9	170	9	Duvaxyn IE T Plus	1
31	2	M	11	173	5	EquipFT	2
32	2	M	11	186	5	EquipFT	2
33	2	M	8	160	5	EquipFT	2
34	4	M	10	191	9	EquipFT	2

35	3	M	8	170	7	EquipFT	2
36	3	G	10	185	7	EquipFT	2
37	4	G	8	170	9	EquipFT	2
38	4	M	8	160	9	EquipFT	2
39	4	M	9	184	10	EquipFT	2
40	3	G	9	173	6	EquipFT	2
41	4	M	9	160	9	EquipFT	2
42	4	M	10	160	9	EquipFT	2
43	3	G	9	170	7	EquipFT	2
44	4	G	9	170	8	EquipFT	2
45	4	M	9	160	9	EquipFT	2
46	4	M	9	184	9	EquipFT	2
47	4	G	9	170	9	EquipFT	2
48	4	M	9	158	9	EquipFT	2
49	4	M	9	160	9	EquipFT	2
50	2	S	12	170	6	EquipFT	2
51	2	S	8	170	5	EquipFT	2
52	7	S	8	170	13	EquipFT	2
53	2	S	11	186	6	EquipFT	2
54	2	S	9	170	6	EquipFT	2
55	3	G	10	173	7	EquipFT	2
56	2	M	11	184	5	EquipFT	2
57	2	G	10	170	5	ProteqFLU TE	3
58	3	S	9	173	7	ProteqFLU TE	3
59	4	G	8	170	9	ProteqFLU TE	3
60	2	S	7	170	5	ProteqFLU TE	3
61	4	S	7	170	9	ProteqFLU TE	3
62	4	G	8	170	9	ProteqFLU TE	3
63	4	G	9	170	9	ProteqFLU TE	3
64	4	G	8	170	10	ProteqFLU TE	3
65	4	S	11	170	9	ProteqFLU TE	3
66	4	G	7	170	9	ProteqFLU TE	3
67	3	S	10	170	8	ProteqFLU TE	3
68	3	S	10	170	8	ProteqFLU TE	3
69	2	S	10	139	5	ProteqFLU TE	3
70	3	G	11	170	7	ProteqFLU TE	3
71	4	M	9	187	9	ProteqFLU TE	3
72	4	M	10	164	10	ProteqFLU TE	3
73	2	M	8	174	5	ProteqFLU TE	3

74	2	M	8	152	5	ProteqFLU TE	3
75	4	M	8	160	9	ProteqFLU TE	3
76	6	M	8	139	12	ProteqFLU TE	3
77	3	M	10	164	7	ProteqFLU TE	3
78	6	M	9	194	12	ProteqFLU TE	3
79	7	M	9	177	16	ProteqFLU TE	3
80	3	S	8	184	8	Duvaxyn IE T Plus	1
81	3	G	11	184	7	Duvaxyn IE T Plus	1
82	2	M	9	184	5	Duvaxyn IE T Plus	1
83	2	M	9	186	5	Duvaxyn IE T Plus	1
84	2	M	9	160	6	Duvaxyn IE T Plus	1
85	2	M	9	160	5	EquipFT	2
86	2	M	9	184	5	EquipFT	2
87	2	M	9	160	6	EquipFT	2
88	2	S	10	186	5	EquipFT	2
89	4	S	9	186	7	EquipFT	2
90	2	S	7	170	5	EquipFT	2
91	2	S	8	186	5	EquipFT	2
92	2	S	9	170	5	EquipFT	2
93	2	M	11	160	6	EquipFT	2
94	2	S	10	170	5	ProteqFLU TE	3
95	2	G	9	170	5	ProteqFLU TE	3
96	2	G	9	170	5	ProteqFLU TE	3
97	4	G	9	170	9	ProteqFLU TE	3
98	3	M	8	165	8	ProteqFLU TE	3
99	4	M	9	191	9	ProteqFLU TE	3
100	4	M	11	170	10	ProteqFLU TE	3
101	3	M	8	188	7	ProteqFLU TE	3
102	2	S	8	173	5	ProteqFLU TE	3
103	2	S	10	173	5	ProteqFLU TE	3
104	2	G	9	173	5	ProteqFLU TE	3

Tabelle 17: Auflistung aller Pferde mit Laufnummer, Gruppe, IKT 1+ 2+ 3, und Nebenwirkungen

Gruppe	Pferd	IKT1	IKT2	IKT3	Nebenwirkungen
1	1	37,5	37,8	37,4	
1	2	37	37,1	37,2	
1	3	37	37,5	37,4	
1	4	36,9	37,6	37,5	
1	5	37,7	38	38,1	
1	6	38,1	37,6	37,4	
1	7	36,9	37,4	37,6	
1	8	37,2	37,3	37,8	
1	9	37,1	37,6	37,8	
1	10	37	37,4	37,7	
1	11	37,8	38	38,1	
1	12	36,9	37,9	38,1	
1	13	36,8	38,1	38,2	
1	14	36,9	37,4	37,8	
1	15	37,8	37,7	37,9	
1	16	36,9	37,8	37,8	
1	17	37,6	38,1	38	
1	18	37,5	37,8	37,9	
1	19	37,1	37,9	38,5	
1	20	38	37,4	38,6	
1	21	37,5	37,6	37,7	
1	22	36,8	38,5	37,7	
1	23	36,3	37,6	37,5	
1	24	37,7	38,1	37,9	
1	25	37,4	37,7	38,3	
1	26	37,4	37,6	38,1	D3: 10x8x0,8 cm UV, schmerzhaft bei Palpation
1	27	37,4	37,9	38,3	
1	28	37,4	37,7	38,2	D3: kleine UV
1	29	37	38,7	38,3	
1	30	37	37,7	37,9	
2	31	37,5	38,7	38,3	D2: kleine UV, schmerzhaft bei Palpation D3: obB
2	32	37,5	38	37,8	
2	33	38	37,7	38,2	
2	34	37,3	38,1	37,7	
2	35	36,3	37,5	37,3	
2	36	37,2	37,2	37,2	
2	37	37,3	37,5	37,7	
2	38	37,1	38,2	38,5	
2	39	37,4	37,5	37,9	
2	40	37,2	37,3	38	

2	41	37,2	37,4	37,6	
2	42	37,7	38,1	37,9	
2	43	37,2	37,1	37,3	
2	44	36,8	37,3	37,4	
2	45	37,8	37,9	37,6	
2	46	37,2	37,3	37,5	
2	47	37,2	37,3	37,8	
2	48	36,3	37,2	37,6	
2	49	37,7	37,4	37,9	
2	50	38	38,5	38,1	D3: kleine UV
2	51	37,8	38,7	37,4	
2	52	37,7	37,4	37,6	
2	53	38	38,3	37,7	D2/D3: kleine UV
2	54	37,8	38,2	38	
2	55	37,9	38	37,8	D2: kleine UV, D3: obB
2	56	37,8	38,1	38,4	D3: kleine UV
3	57	37,8	38,6	38,7	
3	58	37,6	38,8	37,6	D3: 10x8x1cm UV
3	59	37,5	37,3	37,3	
3	60	38	38,9	38,5	D2: schmerzhaft bei Palpation, D3: kleine UV, schmerzhaft
3	61	37,8	37,6	37,7	
3	62	/	/	/	
3	63	37,4	37,8	37,9	
3	64	37,8	37,2	37,4	
3	65	37,7	38,7	37,5	D2: kleine UV D3: obB
3	66	38	37,6	37,7	
3	67	37,9	37,8	37,9	
3	68	37,8	38	37,3	D3: kleine UV
3	69	37,9	38,2	38,2	
3	70	37,8	37,4	37,6	
3	71	37,8	37,7	37,8	D2: kleine UV, D3: 10x8x0,8cm UV
3	72	37,7	38	37,8	
3	73	38,2	38,4	38,3	D2: kleine UV, D3: 12x10x1cm UV, schmerzhaft bei Palpation
3	74	37,8	38,2	37,7	D3: 5x5x0,5 cm UV
3	75	37,9	37,9	37,7	
3	76	38,0	37,6	38,1	
3	77	37,5	38,1	38,2	
3	78	37,2	37,5	37,7	D2: kleine UV
3	79	37,2	37,4	37,3	
1	80	38,2	37,4	37,9	
1	81	37,4	37,8	37,6	
1	82	36,6	37,8	37,8	
1	83	37,6	37,1	38,2	

1	84	37	38,2	38,2	D2/D3: kleine UV, schmerzhaft bei Palpation
2	85	37,9	/	/	Kolik nach Impfung -> Klinik
2	86	38,2	37,8	38,4	D3: kleine UV, schmerzhaft bei Palpation
2	87	37,9	38,6	38,4	
2	88	38	38,3	37,9	
2	89	37,8	37,2	37,5	D2/D3: 10x8x0,8cm UV, schmerzhaft bei Palpation
2	90	37,7	37,4	37,3	
2	91	36,7	37,3	37,5	
2	92	38	38	37,8	
2	93	37,7	37,8	37,8	
3	94	38	38,3	37,5	
3	95	37,5	38	38,7	
3	96	37,6	37,6	38,2	
3	97	36,9	37,8	38,6	
3	98	37,2	38,1	37,8	
3	99	37,7	37,6	37,6	
3	100	37,9	37,7	37,8	
3	101	37,8	38,6	38,1	D3: kleine UV
3	102	37,9	38	38	
3	103	37,9	37,6	38,6	
3	104	37,4	37,8	38,3	

Tabelle 18: Auflistung aller Pferde mit Laufnummer und SRH-Wert in mm<sup>2</sup> für jeden Zeitpunkt

Pferd	D0	D7	D14	D21	D55	D90	D121	D150	D180	D201
1	98,3	196,4	198,7	195,6	161,6	132,2	113,0	keine Probe	keine Probe	keine Probe
2	140,2	184,1	210,3	206,1	186,6	163,6	158,4	144,8	143,7	143,7
3	142,0	211,4	keine Probe	249,4	194,8	171,3	156,3	146,8	143,4	141,0
4	107,7	175,2	214,8	211,9	203,6	182,1	154,1	147,5	146,2	keine Probe
5	86,6	197,7	213,9	131,0	201,0	172,4	152,1	140,9	144,3	142,9
6	74,4	138,1	160,3	153,2	188,3	172,6	156,1	78,2	77,4	76,7
7	138,6	200,7	221,8	215,8	201,9	174,3	173,9	164,0	162,6	146,5
8	180,0	207,8	238,2	214,4	194,8	194,4	157,3	149,3	146,5	139,8
9	85,8	176,7	183,8	185,7	141,8	141,0	141,7	107,4	94,3	87,9
10	155,2	212,2	243,2	236,0	209,7	183,3	157,5	keine Probe	keine Probe	keine Probe
11	116,7	180,6	193,6	199,1	177,9	147,0	117,5	115,4	110,6	109,0
12	85,3	174,2	171,4	159,6	keine Probe	115,7	106,2	100,3	88,3	84,3
13	160,3	206,7	219,1	219,9	195,4	173,7	175,6	159,6	147,5	keine Probe
14	157,2	208,5	217,9	206,0	182,4	159,3	152,7	141,5	137,5	137,1
15	140,9	167,3	170,3	168,5	151,2	137,2	136,1	125,0	123,3	118,6
16	163,5	199,5	210,7	202,6	195,4	175,2	163,7	152,4	149,7	143,8
17	103,3	196,8	201,5	203,6	172,7	147,1	129,3	113,4	108,0	105,4
18	134,5	177,7	keine Probe	196,5	155,9	140,7	137,5	119,8	119,2	113,1
19	80,3	195,6	218,0	215,7	160,9	149,6	123,3	119,1	110,0	102,0
20	110,7	180,5	200,8	199,3	157,0	125,9	119,7	110,1	110,1	107,9
21	144,8	197,9	200,5	201,7	149,0	136,9	129,5	keine Probe	keine Probe	keine Probe
22	94,5	180,9	231,9	208,3	151,0	117,1	112,8	92,6	92,3	keine Probe
23	91,8	185,5	223,9	225,8	155,6	127,4	125,7	keine Probe	keine Probe	keine Probe
24	128,0	189,8	210,8	213,1	151,9	124,2	122,4	116,4	115,6	111,7
25	170,4	192,5	224,1	206,5	178,2	170,2	164,9	134,4	135,1	133,7
26	80,0	188,0	213,3	223,7	175,4	149,9	125,0	keine Probe	keine Probe	keine Probe
27	79,3	204,8	235,3	234,0	162,5	140,4	142,0	126,9	122,7	123,5
28	82,1	216,2	260,5	249,0	188,9	161,3	157,6	keine Probe	keine Probe	keine Probe
29	59,4	199,4	236,7	236,9	191,6	177,5	134,4	115,3	116,1	113,8

30	111,9	181,2	226,4	230,8	206,9	182,1	165,8	keine Probe	keine Probe	keine Probe
31	92,6	218,6	245,9	214,1	171,9	145,1	122,4	116,6	115,7	107,8
32	107,5	176,2	189,3	173,7	148,5	137,3	134,3	131,9	124,3	117,3
33	101,6	173,1	212,5	215,8	161,0	144,8	134,2	113,2	99,5	101,5
34	94,0	178,8	207,3	193,8	160,5	140,5	131,3	121,7	121,6	keine Probe
35	94,5	173,5	189,8	190,1	158,5	139,2	111,1	122,2	116,7	105,5
36	102,4	169,6	185,6	keine Probe	153,4	133,0	117,9	113,7	111,3	108,5
37	97,0	183,0	195,7	188,1	151,1	129,1	130,2	113,7	110,3	keine Probe
38	76,7	129,2	160,9	162,6	134,5	113,7	114,4	keine Probe	keine Probe	keine Probe
39	122,3	188,4	185,6	163,2	136,3	117,5	114,2	116,1	105,7	103,8
40	100,3	214,8	240,5	207,4	190,4	173,1	143,8	keine Probe	keine Probe	keine Probe
41	80,4	162,6	172,2	166,1	130,4	117,5	104,7	91,9	89,2	85,5
42	115,3	184,4	198,1	172,9	170,6	164,7	163,3	159,6	142,1	keine Probe
43	89,4	149,2	172,8	188,7	141,5	127,5	112,3	100,3	98,7	97,2
44	89,2	174,6	188,7	163,6	144,5	129,3	119,3	121,5	118,8	117,3
45	94,6	170,4	180,5	165,0	150,8	136,3	126,6	keine Probe	keine Probe	keine Probe
46	108,9	163,2	178,3	160,5	159,4	132,8	132,3	121,3	115,7	keine Probe
47	106,6	183,2	180,5	179,1	153,6	136,5	123,6	110,4	105,0	105,3
48	113,7	164,1	194,1	159,7	141,1	135,2	125,5	128,9	128,2	124,7
49	105,8	190,7	194,2	194,5	170,2	153,3	146,9	142,2	121,7	119,9
50	103,2	168,6	187,3	187,6	176,0	167,8	160,6	keine Probe	keine Probe	keine Probe
51	91,9	153,1	155,3	159,3	129,8	116,9	113,3	80,3	78,1	keine Probe
52	159,6	200,7	233,8	220,8	192,8	168,2	150,2	171,4	174,9	175,3
53	150,7	208,8	238,6	237,8	196,9	171,7	161,0	keine Probe	keine Probe	keine Probe
54	57,7	146,2	173,5	170,1	118,7	93,9	91,9	98,2	88,4	92,3
55	98,9	206,2	220,2	209,2	122,4	113,1	85,7	keine Probe	keine Probe	keine Probe
56	143,5	241,6	240,7	238,9	204,3	199,5	173,1	151,3	142,6	136,9
57	110,0	122,0	keine Probe	keine Probe	159,7	157,0	134,6	125,9	121,4	125,3
58	121,0	138,8	183,6	189,3	153,6	150,0	138,3	keine Probe	keine Probe	keine Probe
59	142,6	153,9	160,8	159,9	158,3	148,2	134,6	148,6	146,2	140,1

60	122,4	130,9	175,9	175,2	135,8	132,1	127,5	129,1	145,8	keine Probe
61	141,9	148,2	159,2	172,6	157,4	152,8	142,8	153,7	156,6	157,0
62	154,7	152,3	189,0	196,4	157,2	158,1	151,3	153,0	145,9	151,6
63	127,4	144,9	173,9	181,7	159,1	142,6	142,1	138,1	138,5	keine Probe
64	124,4	124,0	137,8	149,6	117,1	106,1	101,9	121,1	119,2	keine Probe
65	138,5	145,7	181,5	159,0	142,4	130,2	122,0	126,4	144,1	144,4
66	100,5	110,6	152,5	141,7	116,3	103,5	101,0	keine Probe	keine Probe	keine Probe
67	128,7	137,7	148,5	163,9	137,6	130,3	122,3	115,9	124,2	120,3
68	105,5	110,8	166,2	173,3	112,8	105,5	102,6	keine Probe	keine Probe	keine Probe
69	101,3	112,4	204,0	keine Probe	173,4	149,0	135,1	keine Probe	keine Probe	keine Probe
70	120,0	140,3	195,0	220,9	193,7	178,8	170,3	150,2	154,7	147,3
71	156,9	156,1	159,2	189,5	169,2	155,9	153,9	139,5	132,7	135,9
72	139,1	142,0	143,3	171,1	131,1	129,5	129,0	120,4	123,8	124,3
73	103,7	107,6	304,2	keine Probe	173,1	131,6	128,6	124,9	117,4	112,8
74	91,7	92,0	137,9	keine Probe	146,0	138,2	130,4	126,0	119,6	keine Probe
75	88,4	85,4	121,7	141,9	126,4	122,9	114,1	110,2	101,3	102,0
76	113,8	117,6	147,8	148,8	113,4	108,5	104,0	107,4	102,5	111,5
77	116,5	127,9	keine Probe	210,9	173,6	167,4	158,7	131,2	131,6	126,8
78	154,4	152,3	170,7	168,2	136,7	130,9	129,8	keine Probe	keine Probe	keine Probe
79	82,8	82,9	130,4	133,6	84,4	82,6	67,5	72,1	76,2	79,1
80	83,7	172,8	193,4	194,3	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe
81	83,4	keine Probe	keine Probe	193,6	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe
82	107,7	175,0	196,5	220,4	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe
83	98,4	169,1	223,4	231,5	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe
84	145,7	210,1	251,2	252,7	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe
85	101,5	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe
86	101,6	220,2	222,4	221,7	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe
87	68,6	183,0	207,1	210,5	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe

88	102,9	151,8	188,4	160,7	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe
89	106,3	146,3	160,5	150,8	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe
90	141,6	keine Probe	205,2	192,1	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe
91	108,8	163,2	184,1	195,9	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe
92	52,3	121,7	138,5	133,1	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe
93	130,9	191,7	221,1	221,0	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe
94	119,2	123,6	149,4	151,6	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe
95	121,3	117,4	143,2	154,1	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe
96	91,3	94,3	115,5	130,4	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe
97	140,0	131,0	165,6	191,0	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe
98	99,1	99,5	118,7	132,4	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe
99	127,4	131,3	162,9	206,5	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe
100	141,8	144,3	keine Probe	193,2	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe
101	68,8	90,0	139,2	159,9	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe
102	110,3	109,0	161,9	157,6	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe
103	89,9	110,9	159,0	163,5	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe
104	78,0	78,0	151,2	146,5	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe	keine Probe

Tabelle 19: Durchschnittliche SRH-Werte in mm<sup>2</sup> aller Pferde zu jedem Zeitpunkt mit Maximalwert und Minimalwert und Standardabweichung

Tage	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
D0	52,3	180	112	27,0
D7	78,0	242	163	36,7
D14	116,0	304	190	34,9
D21	130,0	253	189	30,4
D55	84,4	210	161	26,4
D90	82,6	199	144	24,1
D121	67,5	176	134	22,0
D150	72,1	171	125	21,3
D180	76,2	175	122	22,1
D201	76,7	175	120	21,7

Tabelle 20: Durchschnittliche SRH-Werte in mm<sup>2</sup> aller Pferde jeder Gruppe zu jedem Zeitpunkt im gesamten Verlauf der Studie

Gruppe	Zeitpunkt	Mittelwert SRH-Level in mm <sup>2</sup> ± Standardabweichung	Minimum SRH-Level in mm <sup>2</sup>	Maximum SRH-Level in mm <sup>2</sup>
Duvaxyn IE T Plus®	D0 (n= 104)	115 ± 32,5	59,4	180
	D7 (n= 101)	190 ± 16,6	138	216
	D14 (n= 97)	213 ± 22,9	160	261
	D21 (n= 98)	208 ± 26,6	131	253
	D55 (n= 78)	177 ± 20,5	142	210
	D90 (n= 79)	155 ± 22,1	116	194
	D121 (n= 79)	142 ± 19,7	106	176
	D150 (n= 61)	127 ± 22,2	78,2	164

	D180 (n= 61)	124 ± 22,9	77,4	163
	D201 (n= 49)	119 ± 21,5	76,7	147
Equip FT®	D0 (n= 104)	103 ± 23,1	52,3	160
	D7 (n= 101)	177 ± 26,5	122	242
	D14 (n= 97)	196 ± 26,2	139	246
	D21 (n= 98)	187 ± 26,5	133	239
	D55 (n= 78)	156 ± 22,9	119	204
	D90 (n= 79)	140 ± 23,4	93,9	199
	D121 (n= 79)	129 ± 21,6	85,7	173
	D150 (n= 61)	121 ± 22,2	80,3	171
	D180 (n= 61)	115 ± 21,7	78,1	175
	D201 (n= 49)	113 ± 21,5	85,5	175
Proteq Flu Te®	D0 (n= 104)	117 ± 23,0	68,8	157
	D7 (n= 101)	123 ± 22,5	78,0	156
	D14 (n= 97)	162 ± 34,1	116	304
	D21 (n= 98)	168 ± 23,9	130	221
	D55 (n= 78)	145 ± 25,6	84,4	194
	D90 (n= 79)	135 ± 23,2	82,6	179
	D121 (n= 79)	128 ± 22,5	67,5	170
	D150 (n= 61)	127 ± 19,7	72,1	154
	D180	128 ± 20,7	76,2	157

	(n= 61)			
	D201 (n= 49)	127 ± 21,3	79,1	157

## 10. ABBILDUNGS- und TABELLENVERZEICHNIS

### Abbildungen

Abbildung 1: Aufbau eines Influenzavirus A (Quelle: Friedrich-Loeffler-Institut Insel-Riems, Elektronenmikroskopie: Dr. H. Granzow, Grafikdesign: M. Jörn.)

Abbildung 2: Verlauf der IKT in °C an den 3 Tagen der Messung (D1, D2, D3) der 3 Gruppen (Duvaxyn IE T Plus<sup>®</sup>, Equip FT<sup>®</sup> und ProteqFlu Te<sup>®</sup>) im Vergleich (n= 104)

Abbildung 3: Verlauf der antigenspezifischen SRH-Werte in mm<sup>2</sup> der Pferde, die mit Duvaxyn IE T Plus<sup>®</sup> geimpft wurden  
Abbildung 4: Verlauf der antigenspezifischen SRH-Werte in mm<sup>2</sup> der Pferde, die mit Equip FT<sup>®</sup> geimpft wurden

Abbildung 4: Verlauf der antigenspezifischen SRH-Werte in mm<sup>2</sup> der Pferde, die mit Equip FT<sup>®</sup> geimpft wurden

Abbildung 5: Verlauf der antigenspezifischen SRH-Werte in mm<sup>2</sup> der Pferde, die mit ProteqFlu Te<sup>®</sup> geimpft wurden

Abbildung 6: Verlauf der Antikörpertiter in mm<sup>2</sup> aller drei Gruppen (gelbe Linie: 85 mm<sup>2</sup>, schwarze Linie: 150 mm<sup>2</sup>: Schützender Titer bei Infektionsversuchen)

Abbildung 7: SRH-Level Anstieg in mm<sup>2</sup> zwischen D0 und D21 im Gruppenvergleich mit Minimal- und Maximalwerten sowie Mittelwerten und Standardabweichung

### Tabellen

Tabelle 1: Details der hier eingesetzten Influenza-Tetanus Impfstoffe

Tabelle 2: Impfempfehlungen verschiedener internationaler Gremien

Tabelle 3: Empfehlungen zur Anwendung des Influenza-Impfstoffes der jeweiligen Hersteller

Tabelle 4: Ausschlusskriterien bei Auftreten von Komplikationen

Tabelle 5: Anzahl der entnommenen Blutproben (n) der drei Impfstoffgruppen (Duvaxyn IE-T Plus<sup>®</sup>, Equip FT<sup>®</sup>, ProteqFlu Te<sup>®</sup>) zum jeweiligen Zeitpunkt (D0 bis D201= Tag der Blutentnahme nach der Impfung)

Tabelle 6: Altersverteilung der Pferde in den Impfstoffgruppen (n=104)

Tabelle 7: Geschlechterverteilung der einzelnen Impfstoffgruppen an D0 (n=104)

Tabelle 8: Anzahl der bereits vor der Studie erhaltenen Impfstoffdosen der Probanden der jeweiligen Impfstoffgruppen (n=104)

Tabelle 9: Verlauf der IKT in °C an allen 3 Tagen im Gruppenvergleich

Tabelle 10: SRH-Werte in mm<sup>2</sup> der Pferde in den drei Impfstoffgruppen vor der Impfung an D0 der Studie (n=104)

Tabelle 11: Anstieg des SRH-Wertes in mm<sup>2</sup> von D0 bis D21 in den Impfstoffgruppe

Tabelle 12: Geschlechterverteilung und Anstieg im SRH-Titer-Mittelwert in mm<sup>2</sup> von D0-D21

Tabelle 13: SRH-Wert-Anstiege in mm<sup>2</sup> der Pferde von D0 bis D7, D7 bis D14 und D14 bis D21 der jeweiligen Impfstoffgruppen

Tabelle 14: Abfall der SRH-Werte in mm<sup>2</sup> der Pferde von D21 bis D201 der jeweiligen Impfstoffgruppe

Tabelle 15: Gruppenspezifische Anzahl der Pferde eingeordnet in Kategorie der klinisch bzw. virologisch Ungeschützten zu jedem Zeitpunkt

Tabelle 16: Auflistung aller Pferde mit Laufnummer, Alter, Geschlecht, Alter bei V1 in Monaten, d seit letzter V, V Total, Impfstoffzuteilung und Gruppe

Tabelle 17: Auflistung aller Pferde mit Laufnummer, Gruppe, IKT 1+ 2+ 3, und Nebenwirkungen

Tabelle 18: Auflistung aller Pferde mit Laufnummer und SRH-Wert in mm<sup>2</sup> für jeden Zeitpunkt

Tabelle 19: Durchschnittliche SRH-Werte in mm<sup>2</sup> aller Pferde zu jedem Zeitpunkt mit Maximalwert und Minimalwert und Standardabweichung

Tabelle 20: Durchschnittliche SRH-Werte in mm<sup>2</sup> aller Pferde jeder Gruppe zu jedem Zeitpunkt im gesamten Verlauf der Studie

## **11. DANKSAGUNG**

Mein Dank gilt:

Monica Venner

Paul Schockemöhle

Irish Equine Centre: Ann Cullinane und Jacinta Gahan

Birgit Lehenauer

Vetmed Uni Vienna: Alexander Tichy

Meinem Dokteam: Dusty, Rebecca, Maria

Dem Klinikteam in Lewitz, vorallem Katrin und Hanna

Allen Helfern in Lewitz, die mich/uns so tatkräftig unterstützt haben

Simone und Klaus

Maximilian Kritsch

Max

Meinen Eltern und Geschwistern

Tante Maggie

## 12. SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

### Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation **“Influenza – Impfung bei Pferden: Verlauf der Antikörper – Titer nach einer Booster – Impfung und Vergleich dreier Impfstoffe“** selbstständig verfasst habe. Die Analyse der Proben wurde vom Irish Equine Centre, Co, Kildare, Irland durchgeführt und die statistischen Berechnungen wurden an der Veterinärmedizinischen Universität Wien, Department für biomedizinische Wissenschaften, Bioinformatik und Biostatistik ausgeführt.

Ich habe keine entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar entgeltliche Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Ich habe die Dissertation an folgender Institution angefertigt:

**Klinik für Pferde, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover.**

Die Dissertation wurde bisher nicht für eine Prüfung oder Promotion oder für einen ähnlichen Zweck zur Beurteilung eingereicht.

Ich versichere, dass ich die vorstehenden Angaben nach bestem Wissen vollständig und der Wahrheit entsprechend gemacht habe.

